

Untersuchungen zur Konformation von Nucleosiden und deren Einfluß auf den Ablauf enzymatischer Reaktionen

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der
Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

**Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

von

**Reinhard Pfeil
aus Hirschhorn/Neckar**

Marburg/Lahn 1973

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Untersuchungen zur Konformation von Nucleosiden und deren Einfluß auf den Ablauf enzymatischer Reaktionen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der
Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

Reinhard Pfeil
aus Hirschhorn/Neckar

Marburg/Lahn 1973

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg



Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität
Marburg-Lahn

als Dissertation angenommen am :	4.Juli 1973
Tag der mündlichen Prüfung :	4.Juli 1973
Berichterstatter :	Prof.Dr.Dr.H.Witzel
Mitberichterstatter :	Prof.Dr.H.Follmann

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Betrachtungen zur Konformations- untersuchung	2
2. Bisherige Untersuchungen über Nucleo- sidkonformationen	6
2.1. Sichtung der NMR-Literatur	6
2.2. Untersuchungsgrundlagen	15
3. Die Zuckerkonformation	18
3.1. Untersuchungen zur Zuckerkonformation	20
3.2. Diskussion der Ergebnisse: der Furanosering	21
3.3. Die exo-cyclische 5'-Gruppe	25
4. Die Wechselwirkungen zwischen der Base und dem Zuckerring in Uridin- und Adeno- sinderivaten	26
4.1. Uracil und Adenin als Substituenten der Ribose	28
4.2. Die Ribose und der Zuckerring als Be- standteil der Nucleosidderivate	41
4.3. Der Einfluß von Basen- und Zuckersub- stituenten auf den Torsionswinkel	52
4.4. Das Verhalten von anderen Purin- nucleosiden	58

5.	Intermolekulare Wechselwirkungen und Effekte, die durch Lösungs- mitteleinflüsse hervorgerufen werden	61
5.1.	Lösungsmittelleffekte	61
5.2.	Konzentrations- und Temperatur- abhängigkeit	64
6.	Beziehungen zwischen Konformation und enzymatischem Verhalten	66
7.	Zusammenfassung	70
8.	Experimenteller Teil	73
9.	Literaturverzeichnis	80

1. Einleitung

Bei der Hydrolyse der 3'-5'-Phosphorsäure-Diesterbindung der Ribonucleinsäuren durch verschiedene Ribonucleasen fällt auf, daß die Reaktion häufig von der Gegenwart bestimmter Basen in der Ribonucleinsäure abhängt (Basenspezifität). Hieraus ist zu schließen, daß die Base spezifisch in den Reaktionsablauf eingreift. Dies kann durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke, wie sie bei der Ribonuclease T_1 gefunden wurde (1,2,3), geschehen, durch die das Substrat in einer genau definierten Stellung zum Enzym fixiert und dadurch in einer exakt definierten Lage in Bezug auf das aktive Zentrum festgelegt wird.

Bei der Ribonuclease A weisen Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Spaltung darauf hin, daß die Base mit einem Carbonylsauerstoff in die Katalyse des Bindungswechsels eingreift (4,5,6).

Bei Versuchen zur Spaltung der Phosphorsäurediesterbindung mit der Ribonuclease A und der Ribonuclease T_1 wurden jedoch auch Fälle beobachtet, wo modifizierte Basen alle Strukturelemente besitzen, die zur Reaktion erforderlich erscheinen, in denen aber keine Spaltung erfolgt. Offensichtlich werden hier durch die Modifikation Konformationsänderungen erzwungen, die die Reaktionsgeschwindigkeit gleich um Größenordnungen herabsetzen.

Diese Betrachtungen legen die Frage nahe, wie frei die Base um die glycosidische Bindung drehbar ist und ob für die Base bevorzugte Stellungen in Bezug auf den Zuckerring existieren.

1.1. Betrachtungen zur Konformationsuntersuchung

Untersuchungen zur Konformation der Nucleosidderivate sind wegen der Wichtigkeit des Problems, aber auch schon allein aus theoretischen Erwägungen heraus, von verschiedenen Seiten angestellt worden. Trotzdem gibt es noch keine Lösung des Problems, was wohl durch die Schwierigkeit, die erhaltenen Meßergebnisse eindeutig zu interpretieren, bedingt ist.

Zwei Methoden scheinen besonders geeignet, Anhaltspunkte für die Konformation der Nucleosidderivate zu erhalten:

1. die NMR-Spektroskopie, mit deren Hilfe man anhand der chemischen Verschiebung, der Kopplungskonstanten benachbarter Kerne und durch Abschirmungseffekte räumlich benachbarter Gruppen Einblick in die räumlichen Beziehungen des Moleküls gewinnen kann
2. die Messung des Circular dichroismus, der als Indikator für die Stellung eines Chromophors mit festgelegtem Vektor für das Übergangsmoment in einem asymmetrischen Feld dienen kann.

Röntgenstrukturuntersuchungen können zusätzliche Informationen über die Konformation beitragen, obwohl man hierbei berücksichtigen muß, daß die Verhältnisse im Kristallgitter nicht ohne weiteres mit denen in Lösung verglichen werden können.

Die bisher vorliegenden Daten scheinen darauf hinzuweisen, daß die Base sowohl in Pyrimidin- als auch in Purinnucleosidderivaten normalerweise in "anti"-Stellung steht. Diese Stellung wird bei den

Purinnucleosidderivaten so definiert, daß der N-3-Stickstoff zur 2'-OH-Gruppe der Ribose zeigt. Die um 180° um die glycosidische Bindung gedrehte Lage der Base wird als "syn" bezeichnet. Bei Pyrimidin-nucleosiden ist die Stellung der Base als "anti" definiert, in der das C-6-Proton zur 5'-OH-Gruppe und der C-2-Carbonylsauerstoff zur 2'-OH-Gruppe zeigt. "Syn" ist die um 180° gedrehte Stellung der Base (7) (Abb. 1).

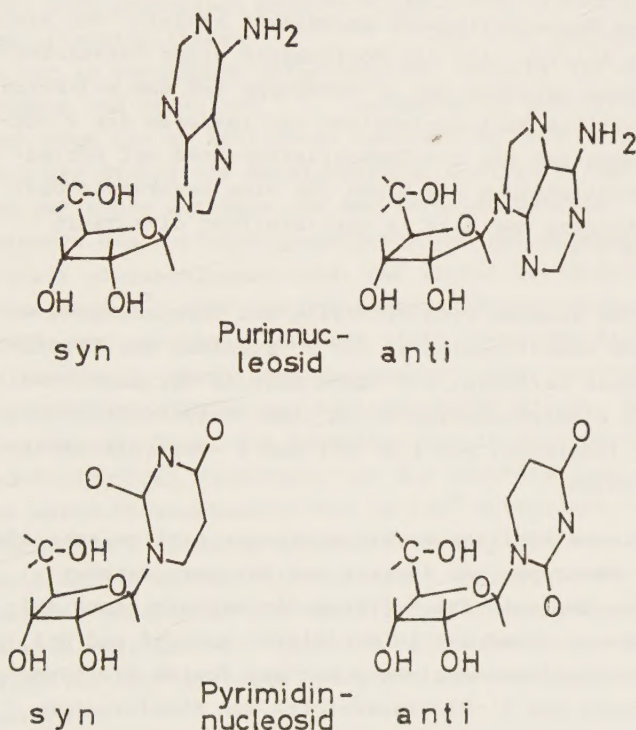


Abb. 1 Syn- und anti-Form a. bei Pyrimidin- und
b. bei Purinnucleosidderivaten

Vergleicht man die Hinweise, die man durch Betrachtungen von Molekülmodellen im Hinblick auf die Bevorzugung einer bestimmten Konformation gewinnt, und die Ergebnisse der Konformationsuntersuchungen mittels NMR- und CD-Messungen, so stellt sich die Frage, aufgrund welcher Faktoren die Base in ihrer bevorzugten Stellung fixiert wird, da sterische Hinderungen nach den Strukturmodellen in den meisten Fällen nicht allzu stark ins Gewicht fallen. Es muß sich bei diesen Kräften um elektromagnetische Wechselwirkungen im Molekül handeln. Von einigen Autoren wird die Möglichkeit einer Wasserstoffbrücke zwischen der 2'-OH-Gruppe und dem N-3-Stickstoff bei Purinnucleosiden und zwischen der 2'-OH-Gruppe und dem C-2-Carbonylsauerstoff bei Pyrimidinnucleosiden als Grund für eine bevorzugte Orientierung der Base in anti-Stellung diskutiert (8,9).

Diese Annahme wird hinfällig bei Verbindungen, wo sich Substituenten in der 2'-Stellung der Ribofuranose befinden, die nicht mehr in der Lage sind, als Elektronenakzeptor in einer Wasserstoffbrücke zu fungieren, wie z.B. bei den 2'-Deoxyribosidderivaten.

Weitere mögliche Wechselwirkungen sind zwischen der 5'-OH-Gruppe des Zuckers und der Base denkbar. Außerdem kann das π -System der Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 in Pyrimidin- und C-8 und N-7 in Purinnucleosidderivaten mit den freien Elektronenpaaren des 4'-Ringsauerstoffs der Ribofuranose wechselwirken.

In der vorliegenden Arbeit habe ich nach Möglichkeiten gesucht, mit deren Hilfe man weitergehende

Aussagen über die Konformationsverhältnisse in den Purin- und Pyrimidinnucleosiden und ihren Derivaten machen kann. Dazu ist es notwendig, die bisher in der Literatur berichteten Daten und ihre Interpretation zu sichten.

Um in Nucleosiden und Nucleotiden über die Stellung der Base in Bezug auf den Zuckerring verständliche Aussagen machen zu können, muß zunächst der Winkel an der glycosidischen Bindung definiert werden. Obwohl sich neuerdings mehrere Winkeldefinitionen in der Literatur finden (7,10,11), die sich teilweise nur im Vorzeichen unterscheiden, scheint die von Donohue und Trueblood (7) aufgestellte Definition doch noch die am häufigsten benutzte zu sein. Hier wird der Winkel als Torsionswinkel definiert, der von der Ebene der Base und der Verbindungslinie zwischen dem C-1'-Kohlenstoffatom und dem Ringsauerstoff eingeschlossen wird. Der Winkel ist definitionsgemäß 0° , wenn das C-2-Kohlenstoffatom entgegengesetzt zum Ringsauerstoff steht. Positive Winkel werden im Uhrzeigersinn gemessen, wenn man vom C-1'-Kohlenstoffatom zum Ringsauerstoff blickt. Die Stellung der Base, die normalerweise in Nucleosiden und Nucleotiden überwiegt, ist die anti-Stellung, die einem Torsionswinkel von ca -30° entspricht. Hierzu muß allerdings angemerkt werden, daß man nicht nur in diesem Fall von einer anti-Stellung spricht, sondern in den Begriff "anti" den ganzen Bereich zwischen $+60^{\circ}$ bis -120° einbezieht. Der Bereich von $+60^{\circ}$ bis $+240^{\circ}$ wird der syn-Stellung zugeordnet.

Um die Konformation eines Moleküls zu bestimmen, muß man nicht nur Aussagen über die einzelnen Bin-

dungslängen im Molekül machen können. Die erfolgreichste und wohl auch genaueste Methode hierzu ist die Röntgenstrukturanalyse, bei deren Auswertung man die Ergebnisse gleich in Winkelgraden und Angström erhält (12,13). Der Nachteil der Röntgenstrukturanalyse ist, daß das Molekül im Kristallgitter eingebaut ist und die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die Struktur in wässriger Lösung übertragen werden können, weil hier mit einer wesentlich geringeren Beeinflussung der Nucleosidderivate-moleküle untereinander gerechnet werden muß. Aus diesem Grunde beschränkt sich die Literatursichtung im wesentlichen auf die Untersuchungen mit Hilfe der Protonen-Kernresonanzspektroskopie.

2. Bisherige Untersuchungen über Nucleosidkonformationen

2.1. Sichtung der NMR-Literatur

Hruska et al. (14) und Schweizer et al. (15) gehen bei ihren NMR-Messungen von der Überlegung aus, daß beim Uridin und seinen Derivaten in anti-Stellung die Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 über dem Zuckerring stehen und der C-2-Carbonylsauerstoff außerhalb des Zuckerringes stehen müßte. Umgekehrt würde in syn-Stellung dann der C-2-Carbonylsauerstoff über dem Zuckerring liegen. Der C-2-Carbonylsauerstoff müßte nun seine Lage in Bezug auf den Zuckerring durch eine chemische Verschiebung der Zuckerprotonen aufgrund eines diamagnetischen Anisotropieeffektes verraten. Um dieses zu untersuchen, haben sie die NMR-Daten von Uridin, 5-Methyluridin, 6-Methyluridin, 6-Oxouridin und β -Cyanursäure-Ribosid (16) miteinander verglichen.

Nach bisherigen Ergebnissen sollen Uridin und 5-

Methyluridin in anti-Stellung und 6-Methyluridin in syn-Stellung vorliegen. Die Base im 6-Methyluridin soll deshalb in syn-Stellung stehen, weil die voluminöse CH_3 -Gruppe in 6-Stellung in Strukturmodellen mit der $5'$ -OH-Gruppe zu engen van der Waal'schen Kontakt haben würde, falls die Base sich in anti-Stellung befindet. Die beiden anderen Verbindungen dienen der Entscheidung der Frage nach syn- und anti-Stellung. Sie haben beide in 2- und in 6-Stellung einen Carbonylsauerstoff, so daß man hier die chemischen Verschiebungen, die durch den diamagnetischen Anisotropieeffekt einer Carbonylgruppe an den Zuckerprotonen hervorgerufen werden, untersuchen kann. Die Ergebnisse von Schweizer et al. (15) sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1 Chemische Verschiebung der Riboseprotonen für verschiedene Pyrimidinnucleoside
Messungen in D_2O ca 0,1 m Lösungen

Verbindung	Chemische Verschiebung in ppm von TMS-Kapillare				
	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5' H-5''
Uridin	5,90	4,34	4,22	4,13	3,85 (14)
5-Methyluridin	6,36	4,69	4,69	4,69	4,34 (15)
6-Methyluridin	6,10	5,27	4,88	4,46	4,30 (17)
6-Oxouridin	6,57	5,10	4,85	4,48	4,20 (18)
β -Cyanursäure-Ribosid	6,10	4,58	4,36	3,96	3,78 (16)

Es zeigt sich, daß die chemischen Verschiebungen der Riboseprotonen im 6-Methyluridin ziemlich weitgehend mit den Verschiebungen der Zuckerprotonen im 6-Oxouridin übereinstimmen.

Die Feststellung bei Schweizer et al. (15), daß auch die NMR-Daten der Zuckerprotonen des β -Cyanursäure-Ribosids, welches wie das 6-Oxouridin in der 2- und 6-Stellung einen Carbonylsauerstoff hat, gut mit den Werten von 6-Methyl- und 6-Oxouridin übereinstimmen, muß aufgrund der von Dugas et al. (16) veröffentlichten und in Tabelle 1 mitaufgeführten Werte, auf die sich auch die Schweizer'schen Angaben beziehen, angezweifelt werden, denn sie stimmen wesentlich besser mit den Daten der Uridin-Zuckerprotonen überein, was auf eine anti-Stellung der Base im β -Cyanursäure-Ribosid hindeuten würde, und nicht, wie von Schweizer et al. interpretiert, auf eine syn-Stellung.

Da die $J_{1,2'}$ -Kopplungskonstanten in 5-Methyluridin und in 6-Methyluridin gleich sind (15), kann man annehmen, daß der Zucker in beiden Verbindungen gleiche Ringkonformation besitzt, so daß durch die Zuckerkonformation keine Änderung der chemischen Verschiebungen auftreten kann. Daher wurde aus den aufgefundenen chemischen Verschiebungen geschlossen, daß nur Uridin und 5-Methyluridin in anti-Stellung, die anderen Verbindungen in syn-Stellung vorliegen.

Auf denselben Grundlagen basierend untersuchte Hruska (19) Uridin, Orotidin und β' -Cyanursäure-Ribosid (Tabelle 2). Er kommt zu dem Ergebnis, daß Orotidin in syn-Stellung und Uridin in anti-Stellung fixiert sind.

Die Interpretation der Meßergebnisse scheint allerdings etwas einseitig angelegt, denn die beobachteten chemischen Verschiebungen der Zuckerprotonen können nicht nur von der veränderten Lage des C-2-Carbonylsauerstoffes herrühren, da bei allen aufge-

Tabelle 2 Chemische Verschiebung der Protonen von Uridin (U), Orotidin (O) und β -Cyanursäure-Ribosid (β -CAR)
Temperatur der Lösungen: U = 28°C, O und β -CAR = 50°C

	Chemische Verschiebung in ppm von internem DSS		
	Uridin	Orotidin	β -Cyanursäure- Ribosid
H ₆	7,862		
H ₅	5,887	5,751	
H _{1'}	5,901	5,558	6,102
H _{2'}	4,341	4,735	4,580
H _{3'}	4,222	4,325	4,365
H _{4'}	4,128	3,935	3,965
H _{5'B}	3,907	3,853	3,848
H _{5'C}	3,803	3,742	3,714

führten Verbindungen gleichzeitig mit der Verlagerung des Carbonylsauerstoffes von außerhalb des Zuckerringes über den Zuckerring auch die Möglichkeit der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoff der Base und der 2'-OH-Gruppe aufgehoben wird.

Ein anderer Weg, zwischen der syn- und anti-Stellung zu unterscheiden, wurde von Ts'o et al. (20,21) eingeschlagen. Sie untersuchten beim Uridin den Einfluß einer Phosphatgruppe auf das Signal des H-6-Protons, wenn sie einmal in 5'-, das andere Mal in 3'-Stellung steht (Tabelle 3). Aufgrund der starken Beeinflussung des H-6-Protons durch die negativ geladene Phosphatgruppe in der 5'-Stellung des Zuk-

Tabelle 3 a. Chemische Verschiebung der Basenprotonen und des H-1'-Protons bei Uridin, 3'- und 5'-Uridylsäure in D₂O
Lösungen ca 0,05 molar pD 6,3

Chemische Verschiebung in ppm
von TMS-Kapillare

Verbindung	H-6	H-5	H-1'
Uridin	8,284	6,314	6,331
3'-UMP	8,311	6,324	6,365
5'-UMP	8,441	6,385	6,412

b. Effekt der Deprotonierung des sekundären Protons der Phosphatgruppe bei 5'-Uridylsäure (5'-UMP) auf die Basenprotonen Uridin als Vergleich
5'-UMP = 0,02 m + 0,02 m 3',2'-UMP
U = 0,1 m

Chemische Verschiebung in ppm
von TMS-Kapillare

Verbindung	H-6			H-5		
	pD 5,9	pD 7,4	Δ	pD 5,9	pD 7,4	Δ
5'-UMP	8,403	8,553	-0,150 ⁺	6,370	6,398	-0,028
Uridin	8,370	8,368	+0,002	6,398	6,373	+0,025 ⁺

kers kommen sie zu demselben Schluß, daß beim Uridin die Base in anti-Stellung vorliegen muß, ande-

⁺Im Original mit 0,130 und 0,005 angegeben, was aber nicht den Differenzen der aufgeführten Meßdaten entspricht.

renfalls wären diese Verschiebungen nicht zu erklären.

Hart und Davis (22) vergleichen die Konformation von Uridin und Cytidin mit der Konformation ihrer 2'-3'-Isopropylidenderivate, und sie kommen bei ihren Untersuchungen, die auf NMR-, NOE- und CD-Messungen beruhen, zu dem Schluß, daß bei den Isopropylidenverbindungen eine geringfügige Änderung der Zuckerkonformation und vor allem eine Änderung des Torsionswinkels für die beobachtete Verringerung der molaren Elliptizität verantwortlich sind.

Die Verringerung der molaren Elliptizität kann man jedoch mit Sicherheit nicht größtenteils auf eine Änderung des Torsionswinkels zurückführen, da durch die Substitution der 2'- und 3'-OH-Gruppe und der damit verbundenen Änderung der Zuckerringkonformation sich auch das asymmetrische Feld am C-1'-Kohlenstoff geändert haben muß.

Über die Zuckerringkonformation in Nucleosiden und Nucleotiden sollten sich Aussagen mit Hilfe der Kopplungskonstanten machen lassen.

Die Spin-Kopplungskonstante hängt in ihrer Größe bei an benachbarten Kohlenstoffatomen sitzenden Protonen von drei Faktoren ab:

1. von der Elektronendichte der C-C-Bindung
2. von der Konfiguration und
3. von der Konformation des betrachteten Moleküls.

Da der Ribofuranosering nur gesättigte C-C-Bindungen hat, und nur β -glycosidische Ribonucleosidderivate betrachtet werden, können auftretende Unterschiede in den Kopplungskonstanten nur durch Kon-

formationsänderungen bedingt sein. Karplus hat anhand einer theoretischen Betrachtung eine Gleichung aufgestellt (23), mit deren Hilfe man die Kopplungskonstanten von Protonen an zwei benachbarten Kohlenstoffatomen in Abhängigkeit von dem Winkel, der bei Aufsicht auf die C_i-C_j -Bindung von den Bindungen C_i-H_i und C_j-H_j eingeschlossen wird, berechnen kann, unter der Voraussetzung, daß die Kohlenstoffatome als sp^3 -Hybride vorliegen und daß das Elektronenorbital und die Elektronen-Dipol-Wechselwirkungen keinen großen Einfluß auf die Kopplungskonstanten ausüben. Den C-C-Abstand hat er in seiner Berechnung mit $1,543 \text{ \AA}$ angenommen.

Karplus-Gleichung:

$$J_{H_i-H_j} = J_0 \cos^2 \varnothing - 0,28 \text{ Hz}$$

$$J_0 = 8,5 \text{ für } 0^\circ \varnothing 90^\circ$$

$$J_0 = 9,5 \text{ für } 90^\circ \varnothing 180^\circ$$

Lemieux et al. (24) fanden bei acetylierten Aldopyranosen, daß die Kopplungskonstanten in Übereinstimmung mit der Karplus-Gleichung zwischen axialen Protonen an miteinander verbundenen Kohlenstoffatomen zwei- bis dreimal größer sind als bei Protonen in anderer Konformation. Sie fanden Werte zwischen 5 und 8 Hz. Das gleiche Ergebnis wurde bei substituierten Äthanen und Äthylenen gefunden, wo die Kopplungskonstanten von transständigen Protonen größer als von gauche- oder cisständigen Protonen sind (25).

Jardetzky (26) untersuchte die Zuckerringkonformation, und verglich die gemessenen Werte mit den nach der Karplus-Gleichung berechneten Werten für die vier möglichen Konformationen. Die hierzu not-

wendigen Winkel wurden an Modellen ausgemessen. Die planare Struktur wurde ausgeschlossen, weil einmal die eclipsed Form an miteinander verbundenen Kohlenstoffatomen gegenüber der staggered Form energetisch ungünstiger ist, und zum anderen, weil der Abstand zwischen O-2' und O-3' mit 2,6 Å geringer ist, als der doppelte van der Waal'sche Radius für Sauerstoff mit 2,8 Å. Die vier möglichen Konformationen (Abb. 2) unterscheiden sich durch verschiedene dihedrale Winkel und damit durch ihre Kopplungskonstanten. Als Kopplungskonstante für $H_{1'}-H_{2'}$ wurde beim Uridin ein Wert von ca 2 bis 3 Hz angegeben. Die berechneten Werte sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Nach den Berechnungen würde für den Zuckerring im Uridin die C-3'-endo-Form resultieren.

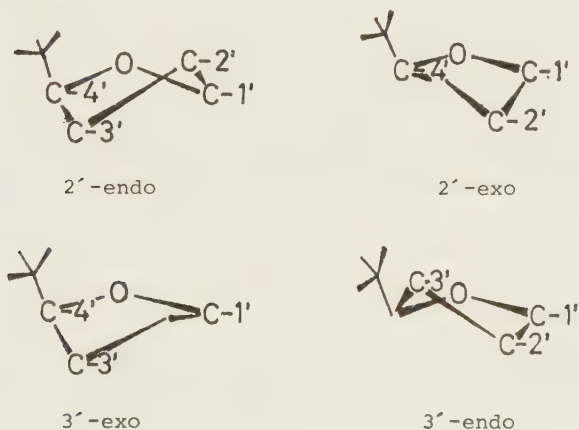


Abb. 2 Mögliche gewinkelte Konformationen des Ribofuranoseringes

Dieselben Untersuchungen haben Hruska et al. (27) durchgeführt, allerdings nicht nur auf der Kopplungskonstanten $J_{1'2'}$ basierend, sondern unter Ein-

Tabelle 4 Berechnete Winkel- und Kopplungskonstanten für die möglichen Konformationen des Zuckerringes (aus 27)

Konformation	$\varnothing 1'2'$	$J_{1'2'}$	$\varnothing 2'3'$	$J_{2'3'}$	$\varnothing 3'4'$	$J_{3'4'}$
C-2'-endo	165°	9,5	45°	4,3	105°	0,4
C-3'-endo	105°	0,4	45°	4,3	165°	9,5
C-2'-exo	100°	0,0	40°	5,0	145°	6,7
C-3'-exo	145°	6,7	40°	5,0	100°	0,0
H-2'-H-3' eclipsed	120°	2,3	0°	9,0	120°	2,3

beziehung aller Kopplungskonstanten der Zuckerprotonen. Hieraus ergibt sich, daß die gemessenen Kopplungskonstanten durch keine der klassischen gewinkelten Formen erklärt werden können, sondern nur durch ein schnelles Wechseln mindestens zweier gewinkelter Konformationen. Die wahrscheinlichsten Wechsel liegen zwischen C-2'-endo und C-3'-endo, wobei der dihedrale Winkel zwischen 105° und 165° wechseln würde, und zwischen C-2'-exo und C-3'-exo, wobei der Winkel zwischen 100° und 145° läge. Aufgrund der zu geringen Genauigkeit der Meßergebnisse kann nicht zwischen den beiden Möglichkeiten entschieden werden.

Röntgenstrukturanalysen von vielen Nucleosiden und Nucleotiden zeigen, daß, mit wenigen Ausnahmen, der Zuckerring so gewinkelt ist, daß das aus der Ebene herausragende C-Atom in endo-Stellung ist (28,29).

Die vorliegenden Untersuchungen lassen Überlegungen über mögliche Fixierungen des Zuckerringes durch intermolekulare Wechselwirkungen vermissen. Meines Erachtens muß man bei der Konformationsuntersuchung

auch solche Effekte in Betracht ziehen, da hierdurch weitere Argumente für eine mögliche bevorzugte Ringkonformation gewonnen werden könnten.

Ganz allgemein muß zu der in der durchgearbeiteten Literatur beobachteten Methode, Daten aus verschiedenen Meßreihen und sogar von verschiedenen Autoren miteinander zu vergleichen, gesagt werden, daß die hierbei auftretenden Verschiebungen sehr leicht zu Fehlinterpretationen führen können, wenn man absolute Werte und nicht nur relative Verschiebungen einzelner Protonensignale zueinander betrachtet.

2.2. Untersuchungsgrundlagen

Die wenigen Basen- und Zuckerprotonen ermöglichen durch ihre relativ einfache Zuordnung, besonders auch durch die leichte Austauschbarkeit der OH- und NH-Protonen durch Deuterium eine Untersuchung der Konformation mittels NMR-Messungen. Hier können Abschirmungseffekte und Einflüsse von Nachbaratomen durch ihre verschiebende Wirkung auf die Protonensignale zur Aufklärung der Konformation ausgenutzt werden.

Im Adenosin und Uridin und ihren Derivaten sind besonders die Heteroatome mit ihren freien Elektronenpaaren in der Lage, starke, abschirmende Felder um sich aufzubauen. Ihre Lage im Molekül sollte durch auffällige Verschiebungen der NMR-Signale räumlich naheliegender Protonen gekennzeichnet sein. Außerdem sind die Doppelbindungen der Basen durch ihre π -Elektronen zur Abschirmung benachbarter Protonen befähigt, besonders, wenn es sich um konjugierte Doppelbindungen oder quasi-aromatische Ringsysteme wie im Adenosin und in geringerem Maße auch im Uri-

din handelt.

Eine andere Art elektromagnetischer Wechselwirkungen sind die Beziehungen zwischen permanenten oder induzierten Dipolen. Die Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 im Uridin und die Doppelbindungen im Adenosin, an denen ein Stickstoff beteiligt ist, sind aufgrund ihrer Polarisierung permanente Dipole. Durch die π -Elektronen in diesen Bindungen besitzen sie zudem auch noch eine leichte Polarisierbarkeit durch äußere Einflüsse. Jedes freie Elektronenpaar ist z.B. in der Lage, mit diesen Dipolen in Wechselwirkung zu treten.

An Strukturmodellen läßt sich zeigen, daß bei einer Drehung der Base um die glycosidische Bindung im Uridin der C-2-Carbonylsauerstoff mit seiner auf dem diamagnetischen Anisotropieeffekt beruhenden Abschirmung hauptsächlich in der anti-Stellung das H-2' tangiert. Alle übrigen Zuckerprotonen, und nur hier kann sich eine Änderung der Abschirmung durch die Base bemerkbar machen, liegen so weit von der Bahn des C-2-Carbonylsauerstoffs entfernt, daß bei ihnen kein großer Effekt durch die Abschirmung erwartet werden darf.

Im Adenosin liegen die Verhältnisse ähnlich, nur daß hier die Abschirmung durch den N-3-Stickstoff hervorgerufen wird, durch den in anti-Stellung eine Abschirmung von H-2' bewirkt werden kann. Er steht ebenfalls - wie der C-2-Carbonylsauerstoff im Uridin - am C-Atom neben dem glycosidisch gebundenen Stickstoff. Da der N-3-Stickstoff aber Glied eines Fünfringes ist, kommt er aus sterischen Gründen nicht so nahe an das H-2'-Proton heran wie der C-2-Carbonylsauerstoff im Uridin, so daß seine abschirmende Wir-

kung dementsprechend geringer sein wird.

In der anti-Stellung findet man beim Uridin aber auch für die dem C-2-Sauerstoff gegenüberliegende Seite, dem C-6-Kohlenstoff mit seinem Proton, Wechselwirkungsmöglichkeiten. H-6 befindet sich im Bereich des Ringsauerstoffs O-4' und des Sauerstoffs der 5'-OH-Gruppe. Untersuchungen (27) unter Heranziehung der H-4'-H-5', H-5''-Kopplungskonstanten haben gezeigt, daß die 5'-OH-Gruppe nicht, wie man eigentlich erwarten würde, so steht, daß sie von der Base wegzeigt, sondern zur Base hin ausgerichtet ist. Bei einer Drehung der Base aus der anti-Stellung heraus muß also sowohl für H-2', als auch für H-6 eine Verschiebung der NMR-Signale nach niederem Feld erwartet werden, da für beide Protonen nur in anti-Stellung mit einer Abschirmung gerechnet werden kann.

Dem H-6 im Uridin vergleichbar ist beim Adenosin das H-8, obwohl auch hier berücksichtigt werden muß, daß C-8 wieder Teil eines Fünfrings ist. Die Wechselwirkungen mit O-4' und O-5' sollten daher aus sterischen Gründen nicht so ausgeprägt sein wie im Uridin. Anders als beim Uridin hat das Adenosin auch in syn-Stellung ein Proton, H-2, welches mit den beiden Sauerstoffen wechselwirken kann. Diese Möglichkeit kann bei der Frage nach syn- oder anti-Stellung der Base von Nutzen sein.

Eine andere Beeinflussung der chemischen Verschiebung der Zuckerprotonensignale kann durch einen Ringstrom in den pseudoaromatischen Basen bewirkt werden. Bei einem Torsionswinkel von -30° und 150° hat ein Ringstrom in der Base allerdings keine große abschirmende Wirkung auf die Zuckerprotonen.

Auch ist der Winkel von etwa 120° , den die Ebene der Base mit der Ebene des Zuckerrings bildet, wenig geeignet für einen größeren Einfluß des Ringstroms auf die Zuckerprotonen. Im Uridin ist der Ringstromanteil nach Berechnungen von Pullmann (30) sowie so vernachlässigbar klein. Im Adenosin ist er ca 30% geringer als im Benzol.

Während also im Uridin die Abschirmung durch die freien Elektronenpaare der Heteroatome ausgeprägter sein wird, muß man beim Adenosin mit einer stärkeren Beeinflussung der Zuckerprotonen durch den Ringstrom rechnen.

Weitere Hinweise zur Konformation der Nucleoside und ihrer Derivate geben die Untersuchungen der Reaktionskinetiken der chemischen Umsetzung zwischen der Base und dem Zuckerring zu den cyclo-anhydro-Verbindungen (31), und das Verhalten der untersuchten Derivate als 3'-verknüpfte Bestandteile eines Phosphorsäurediesters in seiner Eigenschaft als Substrat verschiedener RNasen, die eine ganz bestimmte Konformation erfordern, um überhaupt ihre hydrolisierende Funktion ausüben zu können.

3. Die Zuckerkonformation

Die Zuckerkonformation hat einen erheblichen Einfluß auf die Gesamtkonformation der Nucleosidderivate, da sich Änderungen von ihr auch auf die Wechselbeziehungen zwischen der Base und dem Zucker auswirken. Da die Lage der einzelnen Zuckerprotonen durch ihre Fixierung im Ring festgelegt ist, reicht es zur Bestimmung der Ringkonformation aus, wenn man Aussagen über die Winkel erhalten kann, die die Bindungsach-

sen benachbarter Protonen miteinander bilden. Wenn die Protonen an Kohlenstoffatomen sitzen, die als sp^3 -Hybrid vorliegen, und das Elektronenorbital und die Elektronen-Dipol-Wechselwirkungen keinen großen Einfluß auf die Kopplungskonstanten ausüben, kann man nach der Karplus-Gleichung den experimentell gefundenen Kopplungskonstanten mit recht guter Genauigkeit die entsprechenden Winkel zuordnen.

Im Zucker sind alle Kohlenstoffatome sp^3 hybridisiert, so daß man hier die Karplus-Gleichung zur Berechnung der Winkel, den die einzelnen, benachbarten Protonen miteinander bilden, benutzen kann. Am einfachsten läßt sich die Kopplungskonstante von $H-1'$ $H-2'$ feststellen, da das Signal von $H-1'$ von keinem anderen Signal verdeckt wird, wie es bei den übrigen Zuckerprotonensignalen der meisten Uridinderivate der Fall ist. Nach Berechnungen von Hruska et al. (27) auf der Basis der Karplus-Gleichung ist $J_{1'2'}$, die Kopplungskonstante von $H-1'$ mit $H-2'$, für die $2'$ -endo-Form 9,5 Hz, für die $3'$ -endo-Form 0,4 Hz und für die $2',3'$ -eclipsed-Form 2,3 Hz. Die diesen Berechnungen zugrundeliegenden Winkel wurden an Strukturmodellen ausgemessen. Die Bindungslängen stammen aus Röntgenstrukturanalysen. Allerdings müssen diese theoretischen Werte nicht mit den gefundenen Ergebnissen übereinstimmen, da die Kopplungskonstanten auch noch von der Elektronegativitätsbindungsmaßig benachbarter Atome abhängen (32). Außerdem lassen die relativ niedrigen Energieschwellen zwischen den einzelnen Konformationsisomeren erwarten, daß sich Gleichgewichte zwischen verschiedenen Konformationen einstellen. Für eine Untersuchung schien es zunächst notwendig, die Zuckerringkonformation in Abhängigkeit von Substituenteneffekten

aufzuklären.

3.1. Untersuchungen zur Zuckerkonformation

Es wurden die Kopplungskonstanten der Zuckerprotonen einer Reihe von Nucleosidderivaten gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Die Messungen wurden teilweise in DMSO und in D_2O , in anderen Fällen nur in einem der beiden Lösungsmittel durchgeführt. Bei einigen der untersuchten Verbindungen ist die Zuckerkonformation aufgrund kovalenter Bindungen in einer ganz bestimmten gewinkelten Konformation festgelegt, so daß hier die Übereinstimmung zwischen den mit Hilfe der Karplus-Gleichung berechneten und den experimentell gefundenen Werten überprüft werden kann.

Tabelle 5 Kopplungskonstanten der Zuckerprotonen verschiedener Nucleosidderivate in D_2O und DMSO in Hz

Verbindung	LM	pH	$J_{1'2'}$	$J_{2'3'}$	$J_{3'4'}$
Ribose	DMSO	-	6,2	-	-
	D_2O	6,5	6,2	3,0	-
Uridin	DMSO	-	4,9	5,0	-
	D_2O	6,5	4,4	4,8	5,0
2'-deoxy-Uridin	DMSO	-	6,5/7,0	4,5	-
	D_2O	6,5	6,5/7,0	5,5	-
5'-deoxy-Uridin	DMSO	-	4,5	5,0	6,0
	D_2O	6,5	3,8	5,5	-
2',3'-Isopropyliden-Uridin	DMSO	-	2,2	6,0	3,0
	D_2O	6,5	2,3	5,0	3,8
2'-Thio-Uridin	DMSO	-	-	-	-
	D_2O	6,5	7	-	-

2-Thio-Uridin	DMSO	-	2,0	-	-
	D ₂ O	-	-	-	-
3',5'-cyclische Uridylsäure	DMSO	-	-	-	-
	D ₂ O	6,5	1	-	-
2'-Uridylsäure	DMSO	-	-	-	-
	D ₂ O	8,5	5,7	-	-
3'-Uridylsäure	DMSO	-	-	-	-
	D ₂ O	8,5	4,5	-	-
5'-Uridylsäure	DMSO	-	-	-	-
	D ₂ O	7	4,4	-	-
5,6-Dihydro- Uridin	DMSO	-	5,2	-	-
	D ₂ O	6,5	4,8	-	-
2'-deoxy-2'- azido-Uridin	DMSO	-	5,5	-	-
	D ₂ O	-	-	-	-
Adenosin	DMSO	-	6,0'	-	-
	D ₂ O	6,5	6,0	-	-
2'-deoxy- Adenosin	DMSO	-	7/7	-	-
	D ₂ O	-	-	-	-
2',3'-Isopropyliden-Adenosin	DMSO	-	3,0	6,4	2,0
	D ₂ O	-	-	-	-
3',5'-cyclische Adenylsäure	DMSO	-	-	-	-
	D ₂ O	6,5	0	-	-

3.2. Diskussion der Ergebnisse: der Furanosering

Im Uridin beträgt die Kopplungskonstante $J_{1',2',4,4}$ Hz. Dieses Ergebnis ist nur zu verstehen, wenn man annimmt, daß der Ribosering einem schnellen Konformationswechsel zwischen der 2'-endo- und der 3'-endo-Form unterworfen ist (siehe auch Lit. 27). Zwar würde auch ein Wechsel der Konformationen zwischen der 2'-endo- und 3'-exo-Form oder der 2'-exo- und 3'-exo-Form diese Kopplungskonstanten erklären können, aber Röntgenstrukturuntersuchungen haben gezeigt (28,29), daß der Ribosering in den meisten beobachteten Fällen so gewinkelt ist, daß ent-

weder das 2'- oder 3'-Kohlenstoffatom in der endo-Stellung steht.

An Derivaten, in denen durch kovalente Bindungen die Zuckerkonformation starr festgelegt ist, kann man die Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment überprüfen, und damit auch den Wert der Kopplungskonstanten als Hilfsmittel zur Konformationsaufklärung an der Ribofuranose.

In den 2',3'-Isopropylidenverbindungen der Nucleoside wird der Zuckerring in eine C-2'-C-3'-eclipsed-Form gezwungen. O-4' kann zwischen endo- und exo-Form wechseln. Hier stimmt die berechnete Kopplungskonstante von H-1'-H-2' mit den gemessenen Werten recht gut überein. Da die Signale der Zuckerprotonen bei den Isopropylidenverbindungen im NMR deutlich voneinander getrennt sind, kann man in diesen Fällen die Kopplungskonstanten für alle Ringprotonen messen. Nach Berechnungen müssen die Kopplungskonstanten von H-1'-H-2' und H-3'-H-4' gleich groß, nämlich 2,3 Hz, sein, während die Kopplungskonstante für die in der eclipsed-Form vorliegenden H-2'- und H-3'-Protonen 9,0 Hz betragen soll. Die Meßergebnisse weichen von diesen theoretischen Werten etwas ab. Die geringen Differenzen zwischen dem theoretischen Wert für $J_{1'2'}$ und den gemessenen Kopplungskonstanten deuten an, daß die eclipsed-Form nicht starr eingehalten wird. Die Abweichung von 3 bis 4 Hz bei $J_{2'3'}$ kann auf die starke Elektronegativität der beiden acetalischen Sauerstoffatome an C-2' und C-3' zurückgeführt werden.

Bei den 3',5'-cyclischen Phosphaten muß aufgrund des an C-3' und C-5' ankondensierten Sechseringes die 3'-endo-Form erwartet werden. Die gefundenen Kopp-

lungskonstanten $J_{1'2'}$ für 3',5'-Up(c) und 3',5'-Ap(c) mit Werten zwischen 0 und 1 Hz stimmen mit dem zu erwartenden Wert gut überein. Allerdings kann man in den 3',5'-cyclischen Verbindungen die Kopplungskonstanten der übrigen Zuckerprotonen nicht experimentell bestimmen, da die dazugehörigen NMR-Signale übereinander liegen.

Eine Reihe der untersuchten Uridin- und Adenosinderivate, die keine durch kovalente Bindungen festgelegte Zuckerringkonformation besitzen, zeigen Abweichungen in den Kopplungskonstanten gegenüber Uridin und Adenosin. Wie aus Tabelle 5 zu ersehen ist, gehören alle Derivate in diese Gruppe, bei denen eine denkbare Wechselwirkung zwischen dem C-2-Carbonylsauerstoff und der 2'-OH-Gruppe durch Ersetzen eines Sauerstoffs durch ein anderes Atom oder eine durch Substituenten bedingte Änderung der Basizität eines an der Wechselwirkung beteiligten Sauerstoffs beeinflußt werden kann.

Die Größe der Kopplungskonstanten hängt offensichtlich auch von dem Vermögen des Substituenten in 2'-Stellung ab, als Elektronendonator⁺ in einer Wasserstoffbrücke zu fungieren. Im 2'-deoxy-Uridin, wo in 2'-Stellung das Proton nicht als Elektronendonator in Frage kommt, ist $J_{1'2'}$ 6,5 Hz. Bei den Uridylsäuren zeigt nur die 2'-Uridylsäure eine Abweichung von $J_{1'2'}$ gegenüber Uridin. Durch die Phosphatgruppe am 2'-Sauerstoff wird dessen Elektronendichte gegenüber der in einer OH-Gruppe geschwächt. Die Kopplungskonstante von 5,7 Hz entspricht der geringeren Elektronendonorstärke des 2'-Sauerstoffs.

Das 2'-azido-Uridin hat eine der 2'-Uridylsäure entsprechende Kopplungskonstante für H-1'-H-2'. Bei

⁺ siehe auch Seite 63 ff.

den 2- und 2'-Thioderivaten kommt neben der gegenüber Sauerstoff geänderten Elektronendichte der Schwefelatome auch das größere Atomvolumen als Grund für die beobachteten Änderungen von $J_{1'2'}$ in Frage.

Eine Ausnahme bildet das 5'-deoxy-Uridin, wo weder in der 2-Stellung der Base, noch in der 2'-Stellung eine Änderung gegenüber Uridin eintritt. Die trotzdem zu beobachtende Verringerung von $J_{1'2'}$ auf 3,8 Hz in D_2O und 4,5 Hz in DMSO ist wahrscheinlich auf eine gegenüber dem Uridin geänderte Stellung der Base zurückzuführen.

Im Adenosin ist es wieder möglich, aus den NMR-Ergebnissen die Kopplungskonstanten aller Zuckerprotonen zu bestimmen. Genau wie im Uridin stimmen sie mit keiner der theoretisch berechneten Folge von Kopplungskonstanten für eine der endo- oder exo-Formen überein, so daß auch hier mit derselben Begründung wie beim Uridin ein schneller Wechsel zwischen der 2'-endo- und 3'-endo-Form angenommen werden kann. Zum Uridin besteht allerdings der Unterschied, daß im Adenosin die 2'-endo-Form stärker bevorzugt zu sein scheint.

Während die Differenz zwischen Uridin und 2'-deoxy-Uridin mit gut 2 Hz recht signifikant ist, ist sie zwischen Adenosin und 2'-deoxy-Adenosin kleiner als 1 Hz und kann in dieser Größenordnung auf den Wegfall der elektronegativen 2'-OH-Gruppe zurückgeführt werden.

Für die β -D-Ribofuranose selbst wird ein Wert von ca 3,0 Hz für $J_{1'2'}$ gefunden, was bedeutet, daß die Konformationsverhältnisse denen in dem Zuckerring des Adenosins ähneln müssen.

3.3. Die exo-cyclische 5'-Gruppe

Der zweite, die Gesamtkonformation des Zuckers mitbestimmende Faktor ist die Ausrichtung der C-5'-Gruppe in Bezug auf die C-4'-O-4'-Bindung. Nach Shefter und Trueblood (33) kommen drei energetisch begünstigte Stellungen in Frage, wobei die 5'-OH-Gruppe bevorzugt in gauche-gauche-, gauche-trans- oder trans-gauche-Stellung (27) (Abb. 3) steht.

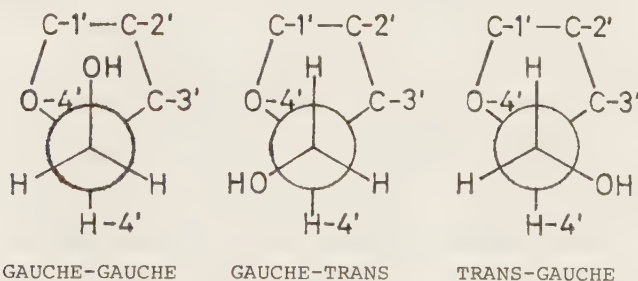


Abb. 3 Die drei möglichen Rotationsisomeren an der C-4'-C-5'-Bindung der Ribofuranose

Beim 5'-deoxy-Uridin, dessen 5'-Kohlenstoff drei gleiche Substituenten hat, ist diese Unterscheidung nicht gegeben. Die NMR-Messung zeigt, daß das Signal der drei Methylprotonen durch H-4' nur zum Dublett aufgespalten wird, was nur bei freier Drehbarkeit der 5'-Gruppe um die C-4'-C-5'-Bindung der Fall ist. Im Uridin und anderen Uridinderivaten mit polaren Substituenten am C-5'-Kohlenstoffatom zeigen dagegen die Kopplungskonstanten, daß die beiden 5'-Protonen nicht symmetrisch zu H-4' stehen, was heißt, daß die freie Drehbarkeit der C-5'-Gruppe eingeschränkt worden ist. Die Tatsache, daß beide Kopplungskonstanten Winkeln im Bereich von 40° bis 60° zugeordnet werden können (27), spricht dafür,

daß die 5'-Gruppe bevorzugt so liegt, daß die 5'-OH-Gruppe zum H-6 der Base zeigt, also in gauche-gauche-Stellung. Im Adenosin liegen die Verhältnisse ähnlich. Bei den 5'-Halogen-Uridinderivaten zeigen die hier gemessenen NMR-Spektren einen Unterschied in der Aufspaltung der Signale der beiden 5'-Protonen zwischen dem 5'-Chlor-, -Brom- und -Joduridin, aber die Unterschiede sind zu gering, um aus ihnen eine signifikante Änderung der Stellung der 5'-Gruppe abzuleiten.

4. Die Wechselwirkungen zwischen der Base und dem Zuckerring in Uridin- und Adenosinderivaten

Um allgemeinverständliche Aussagen über die Konformation der Nucleosidderivate machen zu können, definierten Donohue und Trueblood (7) die Stellung der Base, in der H-6 im Uridin und H-8 im Adenosin zur 5'-Gruppe zeigt, als "anti", die um 180° gedrehte Stellung der Base als "syn". Diese Definition bezeichnet keine exakt, winkelmäßig genau festgelegten Stellungen der Base, sondern Bereiche, in denen Energieminima bezüglich der Rotation um die glycosidische Bindung auftreten können.

In der anti-Stellung muß an folgende Einflußmöglichkeiten zwischen der Base und dem Zuckerring gedacht werden:

1. eine Wasserstoffbrücke zwischen der 2'-OH-Gruppe und dem C-2-Carbonylsauerstoff der Base im Uridin oder dem N-3-Stickstoff im Adenosin
2. eine sterische Behinderung der Rotation der Base um die glycosidische Bindung durch einen Anschlag von dem C-2-Carbonylsauerstoff an H-2'

3. eine Abschirmung durch den diamagnetischen Anisotropieeffekt des C-2-Carbonylsauerstoffs im Uridin (15) an H-2'. Ebenso sollte, wenn auch in geringerem Ausmaß, durch N-3 des Adenosins eine Abschirmung an H-2' auftreten können
4. eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Sauerstoff der 5'-OH-Gruppe und dem H-6 im Uridin oder dem H-8 im Adenosin
5. eine Abschirmung von H-6 im Uridin oder H-8 im Adenosin durch den Sauerstoff der 5'-OH-Gruppe und den O-4'-Ringsauerstoff
6. eine Abschirmung von H-2' durch das freie Elektronenpaar des an der glycosidischen Bindung beteiligten Stickstoffatoms
7. eine Abschirmung von H-2' durch einen in der Base ausgebildeten Ringstrom
8. eine Dipol-Wechselwirkung der Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 im Uridin und N-7 und C-8 im Adenosin mit den freien Elektronen des Ringsauerstoffs und des Sauerstoffs der 5'-OH-Gruppe
9. eine aus der Entropie des Lösungsmittels erklärbare Bevorzugung der kompaktesten Konformation des gelösten Moleküls.

In der syn-Stellung ist die Zahl der zu beachtenden Effekte geringer als in der anti-Stellung. Es sind folgende Beziehungen denkbar:

Im Uridin kann sich eine Wasserstoffbrücke zwischen dem C-2-Carbonylsauerstoff und der 5'-OH-Gruppe, im Adenosin zwischen dem N-3-Stickstoff und der 5'-OH-Gruppe ausbilden.

Die Abschirmungseffekte, wie sie unter 3., 6. und 7. bei der anti-Stellung beschrieben wurden, müssen auch in der syn-Stellung erwartet werden. Es kann daher allein aufgrund der beobachtbaren Abschirmungseffekte an H-2' nicht zwischen der syn- und anti-Stellung unterschieden werden. Es wird im Folgenden versucht, die relativen Anteile dieser denkbaren Wechselwirkungen an der tatsächlichen Molekülgestalt in Lösung anhand vergleichender NMR-Messungen an 41 verschiedenen Nucleosidderivaten aufzuzeigen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

4.1. Uracil und Adenin als Substituenten der Ribose

Wird Uracil am N-1-Stickstoff β -glycosidisch mit dem C-1'-Kohlenstoff eines Ribofuranosemoleküls verknüpft, so sollte hieraus für das C-6-Proton eine stärkere, für das C-5-Proton eine weniger starke Verschiebung der NMR-Signale nach niederem Feld resultieren, da durch die Substitution am N-1-Stickstoff der Base die Elektronen in der Bindung zwischen dem C-1'-Kohlenstoff und dem N-1-Stickstoff wesentlich stärker festgelegt werden, als in der ursprünglichen N-H-Bindung. Hierdurch sollte die Polarisierung der Bindung zwischen C-6 und N-1 in Richtung auf das Stickstoffatom verstärkt werden, und somit auch der Elektronenzug am C-6-Kohlenstoff, was sich in einer Verschiebung des Signals von H-6 nach niederem Feld bemerkbar machen muß. Diese Verschiebung findet man bereits beim N-1-Methyluracil.

Der Vergleich der NMR-Meßergebnisse von Uracil und Uridin zeigt, daß das Signal von H-6 in wässriger Lösung um 0,33 ppm und in DMSO um 0,47 ppm, das Sig-

Tabelle 6 NMR-Daten von Pyrimidin- und Purinnucleosidderivaten in DMSO-d6 und D₂O
 Lösungen in D₂O ca 0,1 molar, in DMSO ca 0,3 molar bei schwerlöslichen
 Substanzen gesättigte Lösungen Verschiebungen in ppm von TMS-Kapillare

Verbindung	LM	pH	H-6	H-5	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'
Ribose	DMSO D ₂ O	- 6,5	- -	- -	4,70 5,35	3,17 3,95	3,41 4,28	3,73 4,51	3,55 4,21
Uracil	DMSO D ₂ O	- 6,5	7,38 7,94	5,46 6,21	- -	- -	- -	- -	- -
Uridin	DMSO D ₂ O	- 2	7,85 8,27	5,63 6,28	5,80 6,30	4,09 4,74	3,98 4,62	3,83 4,50	3,61 4,275
	D ₂ O	10	8,24	6,32	6,39	4,81	4,71	4,53	4,36 4,30
2'-deoxy-Uridin	DMSO D ₂ O	- 6,5	7,85 8,23	5,64 6,27	6,16 6,65	2,11 2,76	4,26 4,84	3,80 4,43	3,60 4,19
2',3'-Isopropyliden- Uridin	DMSO D ₂ O	- 6,5	7,78 8,12	5,64 6,25	5,85 6,27	4,93 5,51	4,75 5,29	4,10 4,79	3,62 4,24
3',5'-cyclische Uridylsäure	DMSO D ₂ O	- 6,5	- 8,10	- 6,33	- 6,27	- (. .	- 5,2	- 4,7	- . .)

Verbindung	LM	pH	H-6	H-5	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'
5'-deoxy-Uridin	DMSO D ₂ O	- 6,5	7,67 8,11	5,70 6,33	5,77 6,25	4,13 4,81	3,92 (4,57 -	3,72 4,34)	1,27 1,87
5'-Brom-Uridin	DMSO	-	7,70	5,70	5,85	4,07	4,00	3,70	3,77
5'-Jod-Uridin	DMSO	-	7,70	5,70	5,83	4,03	3,83	3,47	3,53
2'-azido-Uridin	DMSO	-	7,90	5,70	5,93	4,31	4,10	3,93	(31)
2 -Thio-Uridin	DMSO	-	8,17	6,02	6,59	4,06	3,96	3,84	(34)
N-3-Methyluridin	DMSO	-	7,96	5,77	5,83	4,11	4,03	3,90	3,65
N-3-Aminouridin	D ₂ O	6,5	8,37	6,48	6,41	4,67	4,54	4,42	4,173 4,230 (34)
4-Thio-Uridin	D ₂ O	6,5	-	-	6,33	(. .	4,74	. .)	(15)
5-Chlor-Uridin	D ₂ O	2	8,64	-	6,30	4,79	4,67	4,56	4,28
5-Brom-Uridin	D ₂ O	2	8,74	-	6,30	4,79	4,68	4,57	4,33
5-Jod-Uridin	D ₂ O	2	8,85	-	6,30	4,74	4,70	4,59	4,33
6-Methyluridin	D ₂ O	6,5	-	-	6,10	5,27	4,88	4,46	(17)
6-Oxouridin	D ₂ O	6,5	-	-	6,57	5,10	4,85	4,48	(18)

Verbindung	LM	pH	H-6	H-5	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'	
6-Azaauridin	DMSO	-	-	7,56	5,94	4,28	4,06	3,84	3,48	(34)
5,6-Dihydro-Uridin	DMSO	-	3,40	2,57	5,74	4,00	3,87	3,69	3,54	
	D ₂ O	6,5	4,11	3,28	6,33	4,84	4,69	4,53	4,31	
2'-deoxy-5,6-Dihydro-Uridin	D ₂ O	6,5	3,94	3,14	6,66	2,66 2,57	4,78	4,34	4,14	
N-3-Harnsäureribosid	DMSO	-	-	-	6,45	(. .	4,6	- 3,7	. .)	(34)
N-1-Chinazolindion- β -Ribosid	DMSO	-	-	-	6,58	5,02	4,63	-	4,14	(36)
Orotidin	D ₂ O	6,5	-	5,75	5,56	4,73	4,32	3,93	3,80	(34)
β -Cyanursäure-Ribosid	D ₂ O	6,5	-	-	6,10	4,58	4,36	3,96	3,78	(34)
5'-deoxy-Isopropyliden-Uridin	DMSO	-	7,72	5,68	5,79	5,04	4,59	4,09	1,30	
5'-Chlor-Isopropyliden-Uridin	DMSO	-	7,73	5,67	5,83	5,12	4,82	4,20	3,83	
5'-Brom-Isopropyliden-Uridin	DMSO	-	7,77	5,69	5,86	5,14	4,82	4,25	3,71	
5'-Jod-Isopropyliden-Uridin	DMSO	-	7,77	5,68	5,85	5,13	4,77	4,19	3,45	

Verbindung	LM	pH	H-6	H-5	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'
5'-Cyano-Isopropyliden-Uridin	DMSO	-	7,80	5,68	5,80	5,12	4,79	4,20	2,97
5,6-dihydro-Isopropyliden-Uridin	DMSO	-	3,41	2,57	5,78	4,85	4,65	3,90	3,59
5'-Uridylsäure	D ₂ O	1	8,11	6,30	6,32	-	-	-	-
	D ₂ O	7	8,34	6,30	6,31	-	-	-	-
Uracil-Trialkohol	DMSO	-	7,64	5,62	5,81	-	-	-	-
Verbindung	LM	pH	H-8	H-2	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'
Adenin	DMSO	-	8,46	8,43	-	-	-	-	-
	D ₂ O	6,5	8,61	8,49	-	-	-	-	-
Adenosin	DMSO	-	8,33	8,13	5,90	4,64	4,17	4,03	3,65
	D ₂ O	1	8,78	8,64	6,32	4,94	4,58	4,42	4,05
	D ₂ O	7	8,52	8,30	6,30	5,09	4,77	4,64	4,28
8-Brom-Adenosin	DMSO	-	-	8,17	5,89	5,13	4,28	4,02	3,68
8-Oxo-Adenosin	DMSO	-	-	8,07	5,73	4,91	4,17	3,88	3,57

Verbindung	LM	pH	H-8	H-2	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'
2'-deoxy-Adenosin	DMSO	-	8,30	8,11	6,33	2,81 2,31	4,46	3,91	3,62
5'-deoxy-Adenosin	D ₂ O	7,75	8,315	8,275	-	-	-	-	(37)
2',3'-Isopropyliden-Adenosin	DMSO	-	8,39	8,23	6,16	5,40	5,00	4,29	3,60
3',5'-cyclische Adenylsäure	DMSO D ₂ O	- 6,5	8,30 8,36	8,13 8,26	- 6,26	- -	- -	- -	- -
Guanosin	DMSO	-	7,97	-	5,73	4,43	4,15	3,91	3,64
8-Brom-Guanosin	DMSO	-	-	-	5,70	5,04	4,18	3,86	3,61
8-Oxo-Guanosin	DMSO	-	-	-	5,60	4,84	4,13	3,79	3,54
Xantosin	DMSO	-	7,90	-	5,79	(. .)	4,20	- 3,72	. .)
5'-Adenylsäure	D ₂ O D ₂ O	1 7	8,81 8,93	8,71 8,43	6,37 6,43	4,98 5,17	4,76 4,91	4,64 4,76	4,50 4,43

nal vom H-5 in wässriger Lösung um 0,07 ppm und in DMSO um 0,17 ppm nach niederem Feld verschoben wird. Um festzustellen, ob diese Verschiebungen nur auf dem stärkeren Elektronenzug durch die Ribose am N-1-Stickstoff beruht oder ob andere Einflüsse für diese Verschiebung verantwortlich sind, werden die chemischen Verschiebungen der Uridinprotonen mit den entsprechenden Verschiebungen des Uracil-N-1-Trialkohols (Abb. 4) verglichen. Hier sollte zwar

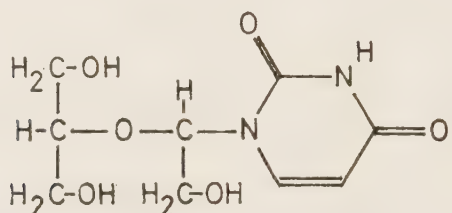


Abb. 4 Uracil-N-1-Trialkohol

die Elektronendichte am N-1 der im Uridin vergleichbar sein, aber der Zuckerring ist zwischen C-2' und C-3' gespalten. Es ist zu erwarten, daß sich die einzelnen CH₂OH-Gruppen mit einer Lösungsmittelhülle umgeben, wodurch der Ringsauerstoff und der Sauerstoff der 5'-OH-Gruppe nicht mehr in die unmittelbare Umgebung der Base kommen. Dadurch werden zum einen die freien Elektronenpaare der OH-Sauerstoffe besser abgeschirmt, zum andern ist ihr räumlicher Abstand zu den Basenprotonen durch die Solvathülle größer. Die Meßergebnisse zeigen, daß im Uracil-Trialkohol H-6 in DMSO um 0,26 ppm und H-5 um 0,16 ppm gegenüber Uracil nach niederem Feld verschoben werden. Während das Signal von H-5 genauso weit nach

niedерem Feld verschoben wird wie im Uridin, wird H-6 um 0,21 ppm weniger weit nach niedерem Feld verschoben.

Diese Meßergebnisse zeigen, daß die chemische Verschiebung von H-6 im Uridin gegenüber der im Uracil nicht nur auf der verringerten Elektronendichte am N-1 beruht, sondern daß zusätzlich noch ein weiterer Einfluß an H-6 wirksam wird, der durch den Zucker ausgeübt wird. Eine Beeinflussung von H-6 durch den Zuckerring ist nur in anti-Stellung möglich. Man kann zunächst daran denken, daß eine Wechselwirkung in Form einer Wasserstoffbrücke zu dem benachbarten C-4'-Sauerstoff oder dem Sauerstoff der 5'-OH-Gruppe besteht. Für den Ringsauerstoff O-4' kann anhand von Daten aus Röntgenstrukturanalysen eine sp^3 -Hybridisierung angenommen werden. Da für eine maximale Überlappung der Orbitale in einer Wasserstoffbrücke eine lineare Bindungsachse erfordert wird (35), im Uridin und seinen Derivaten aber die Achsen der beiden freien sp^3 -Hybridorbitale von O-4' und die Bindungsachse von C-6 und H-6 in anti-Stellung senkrecht zueinander stehen, ist es weniger wahrscheinlich, daß sich hier eine Wasserstoffbrücke zum O-4' ausbildet.

Mit derselben Begründung kann auch eine räumlich mögliche Wasserstoffbrücke zwischen dem Proton der 5'-OH-Gruppe und dem Ringsauerstoff angezweifelt werden.

Günstiger sind die sterischen Voraussetzungen für eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Sauerstoff der 5'-OH-Gruppe und H-6, denn hier kann durch eine Drehung der OH-Gruppe um die Bindung zwischen C-5' und O-5' erreicht werden, daß die Achse eines sp^3 -

Hybridorbitals der freien Elektronenpaare des O-5'-Sauerstoffs und die Bindungsachse durch H-6 und C-6 zur Deckung kommen.

Wenn man hier eine Wechselwirkung in Form einer Wasserstoffbrücke in Betracht zieht, so erscheint der Energiebeitrag aus dieser Wechselwirkung zur Stabilisierung der Lage der Base äußerst gering. Die hier beobachtete Wechselwirkung kann genausogut auch auf der Basis einer induzierten Polarisierung der Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 erklärt werden, die durch die beiden Sauerstoffe O-4' und O-5' bewirkt werden kann. Diese Verschiebung der Elektronen in der Doppelbindung hätte auch eine Polarisierung der Bindung zwischen C-6 und H-6 zur Folge, so daß eine Verstärkung des aciden Charakters von H-6 erreicht und dadurch eine Wechselwirkung zwischen H-6 und O-5' in Form einer Wasserstoffbrücke begünstigt würde.

Um hier zu einer Klärung zu gelangen, wurden 5'-substituierte Uridinderivate synthetisiert und gemessen.

Vergleicht man die NMR-Daten von Uridin und 5'-deoxy-Uridin miteinander, so muß man im 5'-deoxy-Uridin für H-6 eine geringere Verschiebung nach niederem Feld im Vergleich mit Uracil finden als im Uridin, wenn im Uridin eine Wasserstoffbrücke von H-6 zum Sauerstoff der 5'-OH-Gruppe existiert. H-5' sollte dann im 5'-deoxy-Uridin etwas mehr nach niederem Feld verschoben werden als im Uridin. Eine Polarisierung der Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 durch den Sauerstoff der 5'-OH-Gruppe sollte sich beim Wegfall der 5'-OH-Gruppe durch eine ähnliche Verschiebung bemerkbar machen, so daß man an-

hand der NMR-Untersuchungen nicht zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden kann. Dagegen sollte eine Dipol-Wechselwirkung zwischen der Base und dem Ringsauerstoff durch den Fortfall der 5'-OH-Gruppe nicht beeinträchtigt werden. Wird das H-6-Proton im Uridin durch den Sauerstoff der 5'-OH-Gruppe abgeschirmt, muß sich im 5'-deoxy-Uridin die fehlende Abschirmung durch eine Verschiebung des Signals von H-6 nach niederem Feld bemerkbar machen, während das Signal von H-5 unverändert bleiben muß.

In wässriger Lösung wird das Signal von H-6 im 5'-deoxy-Uridin um 0,16 ppm weniger nach niederem Feld, das Signal von H-5 um 0,05 ppm mehr nach niederem Feld gegenüber Uracil verschoben als im Uridin. Im DMSO sind die Werte für H-6 0,18 ppm und für H-5 0,07 ppm. Diese Meßergebnisse sprechen für eine Wasserstoffbrücke von H-6 zum Sauerstoff der 5'-OH-Gruppe oder eine Polarisierung der Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 durch den Sauerstoff der 5'-OH-Gruppe.

Die 5'-Halogenderivate des Uridins zeigen eine ähnliche Tendenz in der Verschiebung von H-5 und H-6, nur daß hier aufgrund der größeren Verteilung der Elektronegativität die zu beobachtenden Effekte nicht so ausgeprägt sind wie zwischen Uridin und 5'-deoxy-Uridin.

Diese Vorstellung wird gestützt durch die Messungen an der 3',5'-cyclischen Uridylsäure, wo der Sauerstoff der 5'-OH-Gruppe durch kovalente Bindungen in trans-Stellung zu dem Ringsauerstoff O-4' fixiert wird. Dadurch steht auch hier, genau wie im 5'-deoxy-Uridin, die 5'-OH-Gruppe nicht mehr für eine

Wechselwirkung mit der Base zur Verfügung. Die Verschiebung der Signale von H-6 um 0,17 ppm nach höherem Feld und von H-5 um 0,05 ppm nach niederem Feld gegenüber Uridin sind die gleichen wie zwischen Uridin und 5'-deoxy-Uridin.

Wird Adenin mit der Ribofuranose zwischen N-9 und C-1' β -glycosidisch verknüpft, so sollte man erwarten, daß H-8 aus den gleichen Gründen wie H-6 beim Uridin nach niederem Feld verschoben wird. Das Signal von H-2 sollte keine große Verschiebung erfahren, da es bindungsmäßig zu weit von N-9 entfernt ist. Die Meßergebnisse zeigen jedoch, daß H-8 im Adenosin in D_2O um 0,09 ppm und in DMSO um 0,13 ppm nach höherem Feld geht, während H-2 in D_2O sogar um 0,19 ppm und in DMSO um 0,30 ppm nach höherem Feld verschoben wird. Dieser Effekt kann auf zwei gegenläufigen Einflüssen beruhen. Die Ribose zieht Elektronen aus der Base ab und verringert dadurch den Ringstrom in der Base. Somit wird die durch den Ringstrom bewirkte Abschirmung nach niederem Feld geschwächt, und die Signale für die beiden in der Ringebene liegenden Protonen werden gleichermaßen nach höherem Feld verschoben. Dieser Einfluß auf die Basenprotonen wird von einem zweiten, durch den induktiven Effekt des Zuckers hervorgerufenen, überlagert. Dadurch wird H-8, welches eigentlich durch den induktiven Effekt des Ribofuranose C-1'-Kohlenstoffs nach niederem Feld verschoben werden sollte, weniger nach höherem Feld verschoben als H-2.

Ähnlich wie im Uridin besteht auch im Adenosin die theoretische Möglichkeit, daß sich zwischen H-8 und C-5' eine Wasserstoffbrücke ausbildet. Außerdem ist zwischen der Doppelbindung von N-7 nach C-8 und den freien Elektronen des Ringsauerstoffs eine Dipol-

Wechselwirkung möglich. Allerdings sind im Adenosin die sterischen Voraussetzungen für eine Wasserstoffbrücke zwischen H-8 und O-5' nicht in dem Maße erfüllt, wie im Uridin. Zum einen ist der Abstand von H-8 zu O-5' größer als die entsprechende Entfernung im Uridin, und zum andern ist der Winkel, den die Bindungsachse von H-8 und C-8 mit der Achse des sp^3 -Hybridorbitals bildet, ungünstig für das Zustandekommen einer Wasserstoffbrücke.

Gremels und Follmann (37) diskutieren diese Möglichkeiten, und kommen zu dem Schluß, daß in DMSO bei Adenosin eine Wechselwirkung zwischen H-8 und dem Ringsauerstoff existiert, da Adenin und 9-Hydroxyalkyladenine in DMSO eine Differenz von H-8 zu H-2 von nur 0,00 bis 0,03 ppm zeigen, während Adenosinverbindungen eine H-8 H-2-Differenz von 0,15 ppm haben. Hier macht auch 5'-deoxy-Adenosin keine Ausnahme, wo trotz des Wegfalls von 5'-OH die Differenz der chemischen Verschiebung von H-8 und H-2 die gleiche ist wie im Adenosin.

In D_2O finden sie zwischen Adenin und 5'-deoxy-Adenosin mit 0,03 ppm keinen Unterschied in der chemischen Verschiebung von H-8 gegen H-2, und führen das auf eine mögliche Wechselwirkung mit den Wasserprotonen zurück.

Eigene Messungen zu diesem Problem an 3',5'-cyclischer Adenylsäure in DMSO und D_2O bringen die gleichen Ergebnisse, daß der Fortfall der 5'-OH-Gruppe als Bestandteil einer möglichen Wasserstoffbrücke in DMSO keinen nennenswerten Einfluß auf die chemische Verschiebung der Basenprotonen hat. Der Vergleich der NMR-Daten von Adenosin und 8-Brom-Adenosin in DMSO zeigt, daß auch der Fortfall des H-8-

Protons keinerlei Einfluß auf die Lage der beiden H-5'-Protonen ausübt.

In wässriger Lösung liegen die Verhältnisse in der 3'5'-cyclischen Adenylsäure ähnlich wie im Adenin, was ebenfalls mit Gremelschen Ergebnissen und den beim Uridin entwickelten Vorstellungen übereinstimmt.

Die Untersuchungen über die Wechselwirkungen im Bereich von O-4', O-5' und H-6 im Uridin und H-8 im Adenosin zeigen, daß im Uridin der Beziehung zwischen H-6 und dem Sauerstoff der 5'-OH-Gruppe die größere Bedeutung zukommt, während beim Adenosin im Bereich von O-4', O-5' und H-8 die polare Wechselbeziehung der Doppelbindung zwischen N-7 und C-8 mit den freien Elektronen des Ringsauerstoffs dominiert.

Ein anderer Weg, die anti-Stellung im Adenosin nachzuweisen, ist der Vergleich von Adenosin mit 5'-AMP. In wässriger Lösung unterscheiden sich die NMR-Spektren von Adenosin und 5'-AMP (Abb. 5) bei pH 1 bis auf die Zuckerprotonen kaum voneinander. Bei pH 7, wo die 5'-Phosphatgruppe in der dianionischen Form vorliegt, ist H-8 im 5'-AMP gegenüber Adenosin um 0,41 ppm nach niederem Feld verschoben. H-2 wird gegenüber Adenosin kaum verändert (20,21).

Ein Einfluß der Deprotonierung der 5'-Phosphatgruppe kann sich nur in der anti-Stellung an H-8 bemerkbar machen. Die Art der Verschiebung deutet auf eine Wasserstoffbrücke von H-8 zu einem der negativ geladenen Sauerstoffe der Phosphatgruppe hin. Natürlich kann man auch hierbei nicht schlüssig eine Polarisierung der Doppelbindung zwischen N-7 und C-8 durch die negativ geladene Phosphatgruppe ausschließen.

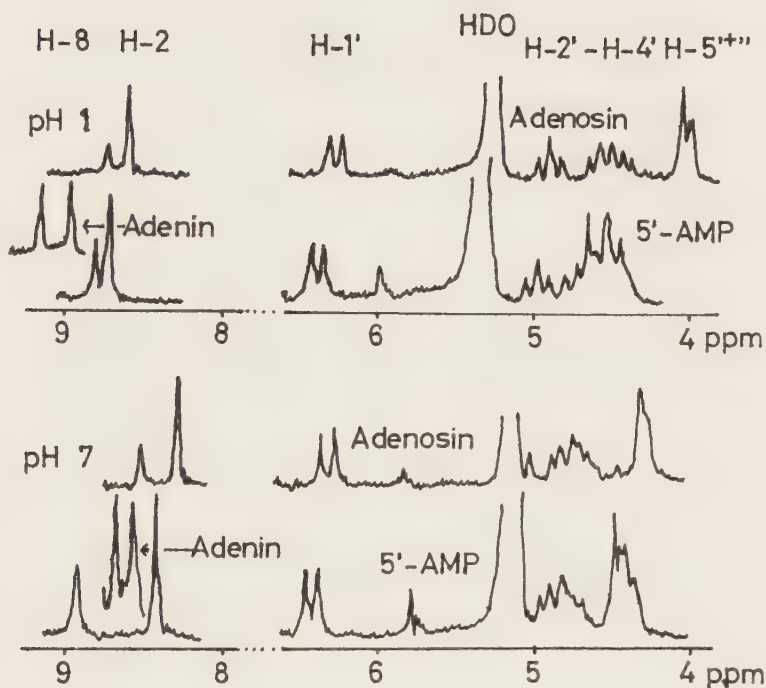


Abb. 5 NMR-Spektrum von Adenin, Adenosin und 5'-AMP in D₂O bei pH 7 und pH 1

4.2. Die Ribose und der Zuckerring als Bestandteil der Nucleosidderivate

Die Ribofuranose hat in wässriger Lösung sechs Protonen, die ein NMR-Signal ergeben. In DMSO kommen noch die vier OH-Protonen hinzu. Das NMR-Spektrum von β -D-Ribofuranose in D₂O sollte so aussehen, daß das Signal von H-1' am weitesten nach niederem Feld verschoben ist, da es an einem Kohlenstoffatom mit

drei elektronenziehenden Gruppen sitzt. Das Signal von H-4' sollte etwas weiter nach höherem Feld liegen, da hier anstelle der 1'-OH-Gruppe die weniger elektronenziehende 5'-CH₂OH-Gruppe steht. Die Signale von H-2' und H-3' müßten dicht zusammenliegen und noch weniger nach niederem Feld verschoben sein als H-4'. Die beiden 5'-Protonen sollten die geringste Verschiebung nach niederem Feld aufweisen. Diese Vorhersage kann sich jedoch dadurch ändern, daß in der β -Konfiguration die 1'- und 4'-Protonen durch die cis-ständigen OH-Gruppen an C-2' und C-3' und das Proton an C-2' durch die 1'-OH-Gruppe abgeschirmt und dadurch nach höherem Feld verschoben werden. Abb. 6 zeigt das NMR-Spektrum in D₂O. Die Zuordnung der einzelnen Signale erfolgte durch Entkopplung. Anhand des Spektrums kann man erkennen, daß die D-Ribose in wässriger Lösung in einem Gleichgewichtsgemisch aus α - und β -Pyranose und α - und β -Furanose vorliegt. Aus den NMR-Daten ergibt sich ein Verhältnis von α - zu β -Pyranose zu α - zu β -Furanose von 20 : 56 : 6 : 18 (47).

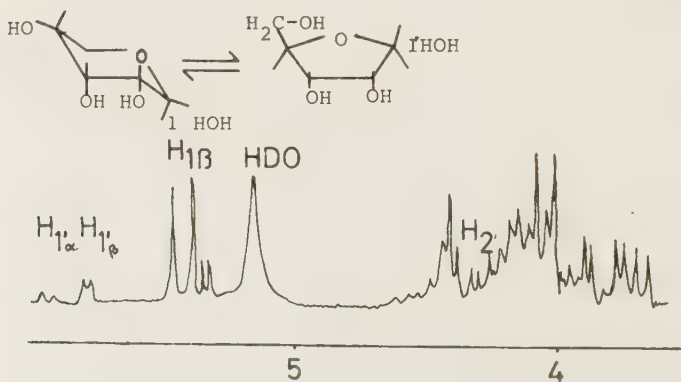


Abb. 6 NMR-Spektrum der D-Ribose in D₂O

Wird in der β -Ribofuranose die 1'-OH-Gruppe durch einen anderen Substituenten ersetzt, so muß sich das in einer Verschiebung der Zuckerprotonensignale widerspiegeln. Ist dieser Substituent das Uracil, so sollten folgende Verschiebungen für die einzelnen Zuckerprotonen erwartet werden:

1. H-1' sollte nach niederem Feld verschoben sein, da Uracil am N-1 einen größeren -I-Effekt hat als die OH-Gruppe.
2. H-2' sollte nach niederem Feld verschoben sein wegen dem Wegfall der Abschirmung durch die 1'-OH-Gruppe und dem noch bemerkbaren induktiven Effekt, den die Uracilbase über die C-C-Bindung auf C-2' ausübt.
3. Für H-3' ist kaum eine Verschiebung zu erwarten.
4. H-4' könnte etwas mehr nach niederem Feld verschoben sein, da sich hier der -I-Effekt der Base über den Ringsauerstoff wieder stärker bemerkbar machen sollte.
5. H-5' sollte kaum verschoben werden.

Die Meßergebnisse zeigen, daß H-1' in wässriger Lösung um 0,64 ppm, H-2' um 0,32 ppm nach niederem Feld verschoben werden. In DMSO liegen die Verhältnisse ähnlich.

Die an Hand der theoretischen Betrachtungen zu erwartenden Verschiebungen werden in den Meßergebnissen bestätigt. Allerdings muß man bei einer Interpretation berücksichtigen, daß durch die Verknüpfung der Base mit dem Zuckerring nicht nur der induktive Effekt von N-1 das Ausmaß der chemischen

Verschiebung der Zuckerprotonen bestimmt, sondern daß auch Abschirmungseffekte der Base und mögliche Wechselbeziehungen zwischen Zuckerring und Base die Lage der Zuckerprotonensignale beeinflussen müssen. Um diese Einflüsse überblicken zu können, ist es notwendig, eine andere Base zum Vergleich heranzuziehen, die andere Wechselbeziehungen zwischen Base und Zuckerring ermöglicht, als dies im Uridin der Fall ist.

Wird Adenin glycosidisch mit der Ribofuranose verknüpft, sollten in etwa die gleichen Verschiebungen der Zuckerprotonensignale wie im Uridin auftreten. Die Meßergebnisse zeigen, daß im Adenosin in wässriger Lösung und in DMSO das Signal von H-2' weiter nach niederem Feld verschoben wird als im Uridin. In D₂O werden H-1' um 0,64 ppm und H-2' um 0,67 ppm nach niederem Feld verschoben.

Am auffälligsten beim Vergleich von Uridin, Adenosin und der Ribofuranose ist die in D₂O um 0,35 ppm, in DMSO um 0,55 ppm größere Verschiebung von H-2' im Adenosin nach niederem Feld als im Uridin. Auch die Signale von H-3' und H-4' sind etwas weiter nach niederem Feld verschoben, während die Signale von H-5' in DMSO im Vergleich mit Uridin weniger weit nach niederem Feld verschoben sind. Für dieses Verhalten bieten sich folgende Erklärungsmöglichkeiten an:

1. Im Uridin wird zwischen der 2'-OH-Gruppe und dem C-2-Carbonylsauerstoff eine Wasserstoffbrücke ausgebildet, wodurch am C-2'-Kohlenstoff die Elektronendichte erhöht und das Signal des 2'-Protons, in schwächerem Ausmaß auch die der übrigen Zucker-

protonen, nach höherem Feld verschoben würden, als es zu erwarten ist. Im Adenosin ist die Ausbildung einer entsprechenden Wasserstoffbrücke aus sterischen Gründen nicht so gut möglich. Der Wegfall der Abschirmung von H-2' durch die 1'-OH-Gruppe muß deshalb beim Adenosin zu einer stärkeren Verschiebung des Signals von H-2' führen.

2. Aufgrund der Substitution der 1'-OH-Gruppe durch einen Substituenten mit einem größeren -I-Effekt als die OH-Gruppe werden die Signale der Zuckerprotonen in beiden Nucleosiden gleichermaßen, im Ausmaß von H-1' nach H-3' abnehmend, nach niederem Feld verschoben. Im Uridin wird der Wegfall der Abschirmung von H-2' durch 1'-OH dadurch kompensiert, daß sich der C-2-Carbonylsauerstoff der Base aufgrund der Behinderung der freien Drehbarkeit der Base um die glycosidische Bindung überdurchschnittlich oft in unmittelbarer Nähe von H-2' befindet und durch seinen diamagnetischen Anisotropieeffekt H-2' abschirmt. Dadurch käme es wieder zu einer Verschiebung nach höherem Feld. Im Adenosin hat der N-3-Stickstoff einen größeren Abstand von H-2' als der ihm im Uridin entsprechende C-2-Carbonylsauerstoff. Dadurch ist sowohl die sterische Behinderung der Base geringer als im Uridin, und somit die Aufenthaltswahrscheinlichkeit von N-3 in der unmittelbaren Umgebung von H-2', als auch wegen der größeren räumlichen Entfernung der Abschirmungseffekt an H-2'. Es ist also, wenn überhaupt, nur mit einer geringen Wirkung von N-3 auf H-2' zu rechnen.

3. Berechnungen von Pullman et al. (30) haben gezeigt, daß in den Ringsystemen der Nucleobasen die Intensität des Ringstroms verglichen mit dem

als 1 gesetzten Ringstrom im Benzöl folgende Werte hat: der Imidazolring im Adenosin 0,7, im Guanin 0,7, der Pyrimidinring des Adenins 0,9, des Guanins 0,2, des Cytosins 0,2 und der des Urazils 0,02. In der anti-Stellung wird das 2'-Proton durch das freie Elektronenpaar des an der glycosidischen Bindung beteiligten Stickstoffs abgeschirmt und das Signal nach höherem Feld verschoben. Bildet sich in der Base ein Ringstrom aus, so wird das Signal von H-2' durch die abschirmende Wirkung des Ringstroms nach niederem Feld verschoben, da H-2' maximal um ca 30° aus der Ebene der Base herausgedreht ist. Je größer der Ringstromanteil in der Base wird, desto mehr überwiegt die Abschirmung des Ringstroms mit ihrer Verschiebung nach niederem Feld die Abschirmung durch die freien Elektronen des N-1 bzw. N-9-Stickstoffs.

Zwischen der Möglichkeit 1. und den auf einer Abschirmung beruhenden Erklärungen kann man eine Entscheidung treffen, wenn man die NMR-Spektren von Uridin- und Adenosinderivaten untersucht, in denen mit Sicherheit keine Wasserstoffbrücke zwischen der Base und der 2'-OH-Gruppe des Zuckerrings ausgebildet werden kann. Hierfür bieten sich die 2'-deoxy- und 2',3'-Isopropylidenderivate an, bei denen das Proton der 2'-OH-Gruppe als elektrophiler Partner für eine Wasserstoffbrücke fehlt.

Zur Unterscheidung können folgende Überlegungen durchgeführt werden:

Ist im Uridin eine Wasserstoffbrücke für die anormale Verschiebung der Zuckerprotonensignale verantwortlich, so muß der Vergleich zwischen Uridin und 2'-deoxy-Uridin eine andere Verschiebung der 2'-

Protonensignale ergeben als zwischen Adenosin und 2'-deoxy-Adenosin.

Das Signal der 1'-Protonen sollte in den 2'-deoxy-Verbindungen trotz des geringeren Elektronenzugs an C-1' nach niederem Feld verschoben werden, weil hier die Abschirmung durch die 2'-OH-Gruppe weggefallen ist. Beim 2'-deoxy-Uridin müßte H-1' etwas weiter nach niederem Feld verschoben werden als im 2'-deoxy-Adenosin, wenn im Uridin die Elektronendichte durch die Wasserstoffbrücke zwischen dem C-2-Carbonylsauerstoff und der 2'-OH-Gruppe größer war als im Adenosin mit seiner freien 2'-OH-Gruppe.

Bei den 2'-deoxy-Derivaten müssen zwei 2'-Protonen betrachtet werden: das α -Proton und das neu hinzugekommene β -Proton (Abb. 7). Beide Protonen soll-

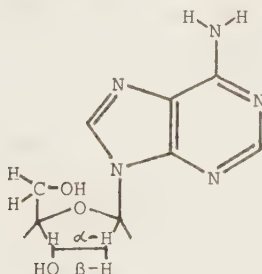


Abb. 7 2'-deoxy-Adenosin

ten ein gemeinsames Signal ergeben, wenn sie nicht durch Nachbargruppen verschieden beeinflusst werden. Resultiert im Uridin die Verschiebung von H-2' nach höherem Feld im Vergleich zum H-2' im Adenosin aus einer Wasserstoffbrücke zwischen der 2'-OH-Gruppe und dem C-2-Carbonylsauerstoff, dann sollten im 2'-deoxy-Adenosin die α - und β -Protonensignale bei annähernd gleichen ppm-Werten erscheinen. Die β -Pro-

tonen sollten weiter nach höherem Feld verschoben sein als die α -Protonen, weil sie durch die benachbarte 3'-OH-Gruppe abgeschirmt werden.

H-3' sollte aufgrund der durch den Wegfall der Wasserstoffbrücke am C-2' geringeren Differenz in der Elektronendichte zwischen Uridin und 2'-deoxy-Uridin gegenüber der Differenz der Elektronendichte an C-2' von Adenosin zum 2'-deoxy-Adenosin weniger nach höherem Feld verschoben sein als das Signal von H-3' im 2'-deoxy-Adenosin.

Abb. 8 zeigt die beiden Spektrenpaare. Das Signal von H-1' wird im 2'-deoxy-Uridin in D₂O um 0,26 ppm, in DMSO um 0,36 ppm nach niederem Feld verschoben, während im 2'-deoxy-Adenosin in DMSO die Verschiebung von H-1' gegenüber Adenosin 0,43 ppm beträgt. Beim 2'-deoxy-Uridin liegen die Signale der beiden 2'-Protonen übereinander, während sie beim 2'-deoxy-Adenosin um 0,5 ppm auseinander liegen. Diese Tatsache und die Verschiebung der 1'-Protonen können als Indiz dafür gewertet werden, daß der Wasserstoffbrücke zwischen der 2'-OH-Gruppe und dem C-2-Carbonylsauerstoff im Uridin keine große Bedeutung zukommt.

Wenn H-2' im Uridin durch die Base, egal ob durch den C-2-Carbonylsauerstoff oder das freie Elektronenpaar des glycosidisch gebundenen Stickstoffs oder im Adenosin durch einen Ringstrom in der Base abgeschirmt wird, muß diese Abschirmung auch in den 2'-deoxy-Verbindungen erhalten bleiben. Die unterschiedliche Differenz in der chemischen Verschiebung der beiden 2'-Protonen im 2'-deoxy-Uridin und 2'-deoxy-Adenosin deutet auf eine Abschirmung des α -Protons im 2'-deoxy-Uridin durch die

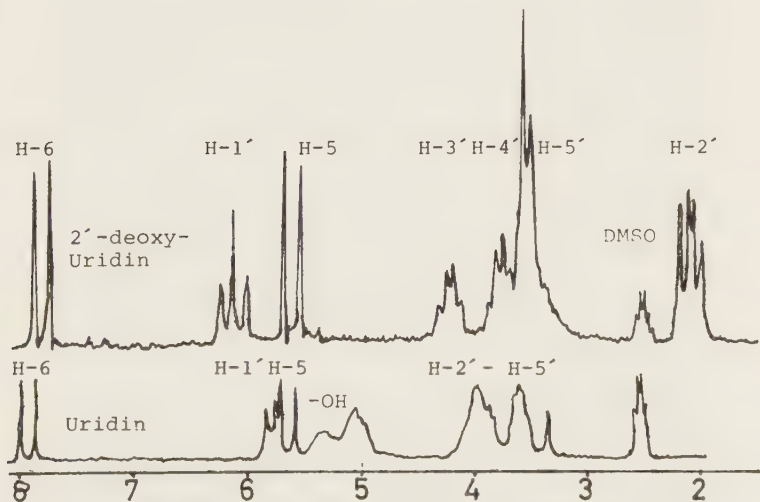
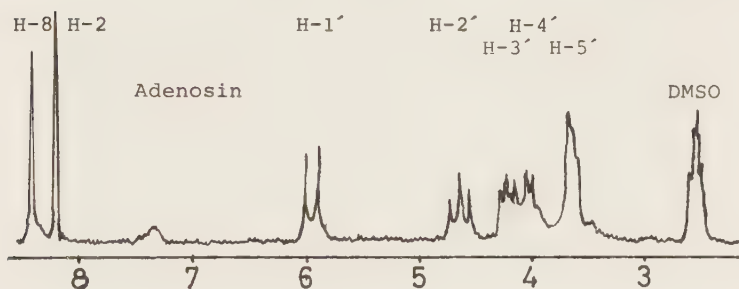
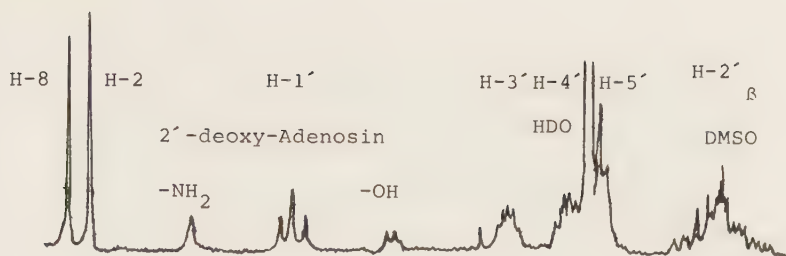


Abb. 8 NMR-Spektren von Uridin und Adenosin und den entsprechenden 2'-deoxy-Derivaten in DMSO

Base hin. Zwar wird das β -Proton am C-2' durch die 3'-OH-Gruppe abgeschirmt und dadurch nach höherem Feld verschoben, aber da auch das α -Proton aufgrund einer Abschirmung nach höherem Feld verschoben ist, ist die Differenz zwischen den beiden Protonensignalen nicht so groß wie im 2'-deoxy-Adenosin, wo nur das β -Proton durch die 3'-OH-Gruppe abgeschirmt und dadurch nach höherem Feld verschoben wird. Für diese beobachteten Abschirmungseffekte kommen nur der C-2-Carbonylsauerstoff oder das freie Elektronenpaar des glycosidisch gebundenen Stickstoffs im Uridin in Frage. Eine Abschirmung von H-2' durch den Ringstrom im Adenosin kann aufgrund dieser Ergebnisse weitgehend ausgeschlossen werden.

Bei den 2',3'-Isopropylidenderivaten ist die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der Base und der C-2'-Gruppe ebenso unterbunden wie in den 2'-deoxy-Nucleosiden. Es gelten hier die gleichen Überlegungen wie bei dem Vergleich der Ribonucleoside mit den entsprechenden 2'-deoxy-Ribonucleosiden. Die Meßergebnisse zeigen, daß die Zuckerprotonen in beiden 2',3'-Isopropylidenverbindungen bis auf geringe Abweichungen, die auf die verschieden starken Konformationsänderungen der Zuckerringe gegenüber den entsprechenden Nucleosiden zurückgeführt werden können, gleichermaßen verschoben werden, was für eine Abschirmung von H-2' und gegen eine Wasserstoffbrücke spricht.

Wenn eine Wasserstoffbrücke zwischen der 2'-OH-Gruppe und der Base im Uridin und Adenosin ausgeschlossen werden kann, bleibt nach den oben angeestellten Überlegungen die Frage offen, wodurch die Abschirmung von H-2' in den Nucleosidderivaten bewirkt wird. Zwischen einer Abschirmung durch den

C-2-Carbonylsauerstoff und den N-1-Stickstoff im Uridin - eine Abschirmung durch den Ringstrom kann hier wohl unberücksichtigt bleiben - sollte man aufgrund der Tatsache, daß für beide Wechselwirkungen verschiedene Torsionswinkel erforderlich sind, unterscheiden können. Soll N-1 an H-2' wirksam werden, muß der Torsionswinkel etwa -30° betragen, wird H-2' durch den C-2-Carbonylsauerstoff abgeschirmt, erfordert dies einen Torsionswinkel um $+60^{\circ}$. Beim Adenosin liegen die Verhältnisse ähnlich. Eine Abschirmung durch N-9 ist nur bei einem Torsionswinkel von ca -30° möglich, während N-3 bei einem Torsionswinkel von 60° wirksam wird. Der Einfluß des Ringstroms, der beim Adenosin berücksichtigt werden muß, ist bei einem Torsionswinkel von -30° bzw. 150° am geringsten und nimmt bei einer Drehung der Base sinusförmig zu.

Betrachtet man die Modelle von Uridin und Adenosin, so sieht man, daß bei einem Torsionswinkel von -30° - nach der Definition von Donohue und Trueblood (7) ist das genau die Mitte des anti-Bereichs - die Wechselwirkung zwischen der Base und dem Sauerstoff der 5'-OH-Gruppe und die Wechselwirkung der Base mit dem Ringsauerstoff begünstigt sein sollten. In 4.1. ist für Uridin eine Wechselwirkung der Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 mit dem Sauerstoff der 5'-OH-Gruppe nachgewiesen worden. Beim Adenosin schien nach den Ergebnissen in 4.1. die Wechselbeziehung zwischen dem Ringsauerstoff und der Doppelbindung zwischen N-7 und C-8 mehr wahrscheinlich. Es ist daher sowohl für Uridin als auch für Adenosin anzunehmen, daß die Base bevorzugt einen Torsionswinkel von -30° einnimmt.

Beim Uridin läßt sich diese Vorstellung noch durch einen Vergleich mit dem 6-Methyluridin erhärten, wo die voluminöse CH_3 -Gruppe in 6-Stellung aus sterischen Gründen eine Drehung der Base erzwingt. Der neue Torsionswinkel liegt bei ungefähr -90° . In dieser Stellung kann das freie Elektronenpaar des N-1-Stickstoffs das 2'-Proton kaum noch abschirmen, wodurch eine Verschiebung von H-2' nach niederem Feld bewirkt werden muß. Der C-2-Carbonylsauerstoff kommt bei diesem Torsionswinkel in die direkte Nachbarschaft von H-1', wodurch H-1' abgeschirmt und sein NMR-Signal nach höherem Feld verschoben werden sollte. Die Messungen von 6-Methyluridin in DMSO

6-Methyluridin in DMSO chemische Verschiebungen
in ppm von TMS-Kapillare (in D_2O siehe Tab. 6)

H-5	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'
5,78	5,68	4,76	4,30	(. 3,7 .)	(34)

zeigen, daß H-1' um 0,12 ppm nach höherem Feld, H-2' um 0,67 ppm und H-3' um 0,32 ppm gegenüber Uridin nach niederem Feld verschoben wird, was in guter Übereinstimmung mit den erwarteten Verschiebungen steht.

4.3. Der Einfluß von Basen- und Zuckersubstituenten auf den Torsionswinkel

Die bisherigen Untersuchungen am Uridin haben gezeigt, daß die Base in anti-Stellung steht und daß man die chemische Verschiebung von H-2' recht gut als Kriterium für die Stellung der Base benutzen kann. H-1' ist nicht ganz so gut geeignet, weil sich hier neben den Wechselbeziehungen zwischen der

Base und dem Zuckerring auch ein geänderter induktiver Effekt der Base auswirken kann.

Auch eine Änderung in der chemischen Verschiebung der 5'-Protonen kann auf eine Drehung der Base hindeuten, da bei einem anderen Torsionswinkel die Wechselwirkung der Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 und der 5'-OH-Gruppe gestört werden muß.

Eine Frage, deren Beantwortung mit Hilfe der oben gewonnenen Ergebnisse möglich sein sollte, ist, wie weit man die Base variieren kann, ohne daß sie sich aus ihrer Normallage herausdreht, da hieraus möglicherweise Rückschlüsse auf die Fixierung der Base gezogen werden können.

Die Messungen zeigen, daß eine Substitution der Base in 2-, 3-, 4- und 5-Stellung keinen großen Einfluß auf die Lage der Zuckerprotonensignale hat.

Bei den 5-Halogen-Uridinen haben alle Zuckerprotonen bis auf geringe Abweichungen die gleiche Lage wie die entsprechenden Protonen im Uridin. Nur H-6 wird vom 5-Chlor-Uridin zum 5-Jod-Uridin hin zunehmend stärker nach niederem Feld verschoben. Die Umkehrung der Reihenfolge beruht auf einem der Elektronegativität gegenläufigen Abschirmungseffekt des Halogenatoms.

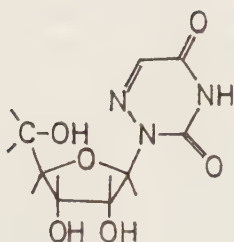
Das 4-Thio-Uridin zeigt ebenfalls keine großen Abweichungen der Zuckerprotonensignale gegenüber Uridin.

Wird Uridin am N-3 substituiert, tritt eine der geänderten Elektronendichte in der Base entsprechende Verschiebung von H-6 und H-5 auf. Die Zuckerprotonen werden nur wenig beeinflusst.

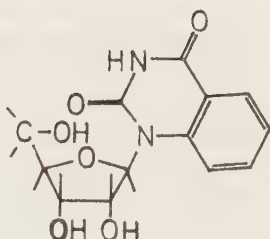
Beim 2-Thio-Uridin sind die H-2'-, H-3'- und H-4'-Protonen mit denen im Uridin in DMSO identisch. Die 5'-Protonen werden um 0,09 ppm nach niederem Feld verschoben, was sich mit einem stärkeren Elektronenmangel in der Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 und einer dadurch begünstigten Wechselwirkung zwischen der 5'-OH-Gruppe und der Base im Bereich von C-6 erklären läßt. Für einen stärkeren Elektronenmangel in der Doppelbindung spricht die Verschiebung von H-5 um 0,39 ppm und von H-6 um 0,25 ppm nach niederem Feld. Die stärkste Verschiebung erfährt H-1', welches um 0,79 ppm nach niederem Feld verschoben wird. Zum einen wird die geänderte Elektronendichte am N-1-Stickstoff mitverantwortlich sein für diese Verschiebung, zum andern aber auch der Schwefel in der 2-Stellung, der aus sterischen und orbitalabhängigen Gründen eine ganz andere Abschirmung bewirken kann als der C-2-Carbonylsauerstoff im Uridin.

Substituiert man die Base in 6-Stellung, werden folgende drei unterschiedliche Gruppen bezüglich der Verschiebung der Zuckerprotonensignale beobachtet:

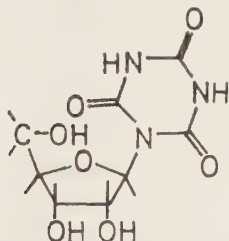
1. H-1', H-2' und H-3' werden deutlich nach niederem Feld verschoben gegenüber Uridin. Dies ist der Fall bei Substituenten, die die Elektronenverteilung und Elektronendichte in der C-5-C-6-Doppelbindung stark beeinflussen, also im 6-Azauridin, im 1- β -D-Ribofuranosyl-2,4-Chinazolindion, im β -Cyanursäureribosid und im β -Barbitursäureribosid (Abb. 9). Die Verschiebung von H-1', H-2' und H-3' nach niederem Feld weist auf eine Drehung der Base um ca 90° hin, weil für diesen Fall alle drei Zuckerprotonen aus dem Bereich der Abschirmung durch den C-2-Carbonylsauerstoff oder den N-1-Stickstoff



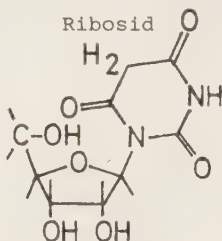
6-Azaauridin



1-β-D-Chinazolinindion-



β-Cyanursäure-Ribosid



β-Barbitursäure-Ribosid

Abb. 9 Einige in 6-Stellung substituierte Pyrimidinnucleosidderivate

herausgedreht werden. Eine Torsionswinkeländerung von mehr als 90° erscheint wenig sinnvoll, weil einige der aufgeführten Verbindungen ja auch in 6-Stellung einen Carbonylsauerstoff tragen, in dessen Abschirmungsbereich H-1', H-2' und H-3' dann kommen würden.

2. Wenn der Substituent in 6-Stellung keinen großen Einfluß auf die Elektronenverteilung der Base ausübt wie im 6-Methyluridin und im Orotidin, wird H-1' nach höherem, H-2' und H-3' nach niederem Feld verschoben. Wie weiter oben ausgeführt, spricht diese Verschiebung für eine leichte Drehung der Base entgegen dem Uhrzeigersinn.

Aus dem UV-Spektrum geht hervor, daß in Orotidin die -COO^- -Gruppe nicht in Konjugation mit der Base steht.

3. Im N-3-Harnsäureribosid, das auch als 5,6-disubstituiertes Uridinderivat betrachtet werden kann, wird nur das Signal von H-1' und H-4' nach niederem Feld verschoben, was durch die geänderte Elektronendichte in der Doppelbindung zwischen C-5 und C-6, und der damit verbundenen Beeinflussung der Wechselwirkung der Doppelbindung mit dem Ringsauerstoff erklärt werden kann. Da an den anderen Zuckerprotonen kaum eine Verschiebung gegenüber Uridin zu beobachten ist, darf angenommen werden, daß der Harnstoffrest, der die 5,6-Stellung überbrückt, der Base keine Änderung des Torsionswinkels aufzwingt, wie die Methylgruppe im 6-Methyluridin.

Die letzte Gruppe bilden die Derivate, bei denen die Base unverändert bleibt und nur der Zuckerring variiert wird. Da die Fixierung der Base durch intramolekulare Wechselwirkungen durch den Wegfall hierfür notwendiger funktioneller Gruppen beeinflusst werden muß, kann die Verschiebung der Signale von H-5 und H-6 gegeneinander als Indikator für eine Änderung des Ausmaßes der Wechselwirkung zwischen dem Ringsauerstoff O-4' und dem Sauerstoff der 5'-OH-Gruppe einerseits und der Base im Bereich von C-6 andererseits benutzt werden.

Abgesehen vom 2',3'-Isopropyliden-Uridin, wo der Zuckerring durch den ankondensierten Fünfferring fixiert ist, ändert sich die chemische Verschiebung und die Differenz zwischen den Signalen von H-5 und H-6 nur unwesentlich, wenn der Zucker in 2'- oder 3'-Stellung substituiert wird.

Bei den in 5'-Stellung substituierten Uridinderivaten zeigt sich, daß die Beeinflussung der chemischen

Verschiebung vom 5'-deoxy-Uridin über das 5'-Chlor-, 5'-Brom- und 5'-Jod-Uridin zum Uridin hin zunimmt. Mit steigender Elektronendichte und Atomgröße steigt also der Einfluß der 5'-Gruppe auf die Base im Bereich von C-6.

Beim 5'-UMP ist der Einfluß von O-5' geringer als im Uridin. Bei pH 7, wenn die Phosphatgruppe in der dianionischen Form vorliegt, ist der verschiebende Effekt des 5'-Sauerstoffs größer als im Uridin, was den Verhältnissen bezüglich der Elektronendichte an O-5' genau entspricht.

Wie zuvor schon diskutiert, kann die Verschiebung des C-6-Protons durch den Einfluß der Phosphatgruppe in der 5'-Stellung nicht allein auf eine Wasserstoffbrücken ähnliche Beziehung zurückgeführt werden. Der Haupteffekt scheint von der negativen Ladung der Phosphatgruppe auszugehen, die ihrerseits zu einem diamagnetischen Anisotropieeffekt führt. Besonders stark ist dieser Effekt bei den 5'-Carbonsäuren, wie am Beispiel des 5-Nitrouridins und der 5-Nitro-5'-Uridincarbonsäure demonstriert werden kann. Beim 5-Nitrouridin liegt das Signal für das C-6-Proton bei 9,57 ppm, bei der 5-Nitro-5'-Uridincarbonsäure ist das Signal um 1,27 ppm nach niederem Feld verschoben. NMR-Meßergebnisse siehe Tabelle 7. Die Lage der Zuckerprotonensignale von H-2', H-3' und H-4' ist in beiden Verbindungen gleich. Nur H-1' ist in der 5'-Carbonsäure um 0,16 ppm nach höherem Feld verschoben. Die gleiche Beobachtung hat Gremels in seiner Diplomarbeit⁽³⁷⁾ beim Vergleich von Adenosin und Adenosin-5'-Carbonsäure gemacht. Er findet für H-8 in der Carbonsäure in DMSO eine Verschiebung bis 1,04 ppm.

Tabelle 7 NMR-Daten von 5-Nitrouridin und der
5-Nitro-5'-Uridincarbonsäure in D₂O

Chemische Verschiebung in ppm von TMS-Kapillare						
Verbindung	H-6	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'
5-Nitrouridin	9,57	6,72	(..5,15-4,85..)			4,3
5-Nitro-5'-Uri-10,84 dincarbonsäure		6,56	(..5,15-4,85..)			-

4.4. Das Verhalten von anderen Purinnucleosiden

Außer den 5'-Protonen liegen im Vergleich zum Uridin die Zuckerprotonen der meisten Purinnucleosid-derivate nach niederem Feld verschoben. Dies kann auf eine Abschirmung durch den Ringstrom in der Base oder auf die fehlende Abschirmung durch den C-2-Carbonylsauerstoff zurückgeführt werden. In Derivaten, wo kein Ringstrom ausgebildet wird, müssen die Zuckerprotonen eine der dem Uridin ähnliche chemische Verschiebung zeigen, wenn die Base in anti-Stellung steht.

Adenosin und Guanosin haben nach den Pullmanschen Berechnungen den gleichen Ringstrom im Imidazol-Ring. Im Pyrimidinring hat Adenosin einen wesentlich größeren Ringstrom als Guanosin. Die Signale von H-3' und H-5' sind identisch, alle anderen Signale sind im Guanosin zwischen 0,12 ppm für H-4', 0,21 ppm bei H-2', 0,17 ppm für H-1' und 0,36 ppm bei H-8 nach höherem Feld verschoben. Da die Lage der Zuckerprotonen in den C-8 substituierten Derivaten von Adenosin und Guanosin ähnlich ist, muß

die Verschiebung im Guanosin gegenüber Adenosin auf zwei verschiedenen Torsionswinkeln der Basen beruhen oder von einem geringeren Ringstrom und damit einer geringeren Abschirmung herrühren. Beide Effekte können auch zusammen wirken. Für Adenosin war aufgrund der Wechselwirkungen zwischen H-8 und der negativ geladenen 5'-Phosphatgruppe im 5'-AMP und zwischen der C-8-N-7-Doppelbindung und dem freien Elektronenpaar des Ringsauerstoffs ein Torsionswinkel von ca -30° gefunden worden.

Im Guanosin scheint die Base aus dieser Stellung herausgedreht zu sein. Im Adenosin deutet das verschiedenartige Verhalten von H-4' auf eine Wechselwirkung zwischen der N-7-C-8-Doppelbindung und den freien Elektronen des Ringsauerstoffs hin. Ein direkter induktiver Effekt durch die Base ist kaum möglich, auch eine Abschirmung durch den Zuckerring ist unwahrscheinlich. Im Guanosin dürfte diese Wechselwirkung nicht auftreten. Dadurch werden die freien Elektronen des Ringsauerstoffs nicht von O-4' abgezogen, die Elektronendichte an O-4' und damit auch an C-4' steigt, wodurch H-4' nach höherem Feld verschoben wird. Denselben Effekt kann man bei den 8-oxo- und 8-Brom-Derivaten von Adenosin und Guanosin beobachten.

Die Verschiebungen von H-8 und H-2' sprechen, entgegen den Pullmanschen Berechnungen, dafür, daß im Guanosin nicht nur der Ringstrom im Pyrimidinring, sondern auch im Imidazol-Ring schwächer ist als im Adenosin.

In anti-Stellung wird H-1' durch den Ringstrom im Pyrimidinring abgeschirmt, und eine Verringerung des Ringstroms bringt eine Verschiebung von H-1'

nach höherem Feld mit sich. Die Änderung der Signale von H-8 und H-2' können entweder durch eine starke Änderung der Elektronendichte im Imidazol-Ring oder durch eine Verringerung des Ringstroms in ihm bedingt sein. Die zweite Möglichkeit scheint die wahrscheinlichere zu sein, denn eine große Änderung der Elektronendichte im Imidazolring zwischen Adenosin und Guanosin ist nicht einzusehen.

Im Xanthosin haben die Zuckerprotonensignale eine ähnliche Lage wie im Uridin. Daß die Zuckerprotonen eine ähnliche chemische Verschiebung aufweisen wie die des Uridins, kann dadurch erklärt werden, daß im Xanthosin kein Ringstrom ausgebildet wird, und somit H-2' und H-3' nur durch den an der glycosidischen Bindung beteiligten Stickstoff abgeschirmt werden.

Bei den 8-substituierten Adenosin- und Guanosinderivaten ergeben gleiche Substituenten ähnliche Verschiebungen der Zuckerprotonensignale. In den 8-Brom-Derivaten wird hauptsächlich das Signal von H-2' nach niederem Feld gegenüber den Ausgangsverbindungen verschoben. Im 8-Brom-Adenosin beträgt die Verschiebung 0,49 ppm, im 8-Brom-Guanosin 0,61 ppm. Die Verschiebung von H-2' nach niederem Feld zeigt, daß sich die Base aus der anti-Stellung herausdreht, wodurch H-2' seine Abschirmung verliert. Bei den 8-Oxo-Derivaten werden bis auf H-3' alle Zuckerprotonensignale verschoben. H-1' geht in 8-Oxo-Adenosin um 0,17 ppm nach höherem Feld, H-2' um 0,27 ppm nach niederem Feld, H-4' um 0,15 ppm und H-5' um 0,08 ppm nach höherem Feld. Für 8-Oxo-Guanosin sind die Werte 0,13 ppm, 0,41 ppm, 0,12 ppm und 0,10 ppm. Bei diesem Verschiebungsmuster darf angenommen werden, daß die 8-Brom- und 8-Oxo-Deriv-

vate unterschiedliche Torsionswinkel besitzen. Die Verschiebungen von H-1' und H-2' bei den 8-Oxo-Verbindungen deuten auf eine Drehung der Base aus der ursprünglichen Lage in einen Winkel von ca 150°. Damit kommt der 8-Oxo-Sauerstoff in die direkte Nachbarschaft des C-1'-Protons. Gleichzeitig wird eine Abschirmung am 2'-Proton aufgehoben. Die Verschiebung der Signale von H-4' und in geringerem Maße auch von H-5' kann auf den Wegfall bzw. die Aufhebung der Wechselwirkung der N-7-C-8-Doppelbindung mit dem freien Elektronenpaar des Ringsauerstoffs, die bei diesem Torsionswinkel wegfällt, zurückgeführt werden. Bei den 8-Brom-Verbindungen müßte die Base einen Torsionswinkel von -90° einnehmen. Das Bromatom hätte dann in etwa die gleiche Lage wie die Methylgruppe im 6-Methyluridin, nämlich dicht über dem Zuckerring.

5. Intermolekulare Wechselwirkungen und Effekte, die durch Lösungsmiteleinflüsse hervorgerufen werden

5.1. Lösungsmittelleffekte

Die für diese Arbeit durchgeführten NMR-Messungen von Nucleosidderivaten wurden in D₂O und deuteriertem DMSO vorgenommen. Wasser kann als ambivalentes Lösungsmittel sowohl als Protonenakzeptor als auch als Protonendonator fungieren. DMSO hat keine acide Protonen, und kann daher nur als Protonenakzeptor wirken. Allerdings ist der Sauerstoff im DMSO basischer als im Wasser. Löst man ein Nucleosid in D₂O, so werden die Wassermoleküle einen recht engen Lösungsmittelkäfig um das Nucleosidmolekül aufbauen, da sie sich durch ihre geringe Größe dem Fremdmole-

kül recht gut anpassen können und aufgrund ihres Vermögens zur Selbstassoziation in der Lage sind, ein relativ stabiles Gefüge aufzubauen. Dem Nucleosidmolekül in diesem Lösungsmittelkäfig wird eine recht große Anzahl von Assoziationsstellen geboten. Im DMSO sind die Möglichkeiten der Wechselwirkung mit dem darin gelösten Nucleosid wesentlich geringer. Die Assoziation des Lösungsmittels ist wesentlich schwächer als im D_2O , so daß bei einer Konformationsänderung des gelösten Nucleosidmoleküls keine allzu große Entropieänderung des Lösungsmittels zu erwarten ist. Gerade dieser Faktor spielt jedoch beim Wasser als Lösungsmittel eine starke Rolle, was auch durch die von Prestegard und Chan (38) gefundenen Konformationsänderungen in Gegenwart von höheren Salzkonzentrationen bestätigt wird. Diese Vermutung, daß die Entropie des Wassers einen erheblichen Beitrag zur Stabilität der Konformation leistet, führte zur Synthese des 2'-deoxy-5,6-Dihydrouridins. Bei dieser Verbindung fehlt die Möglichkeit einer Dipolwechselwirkung zwischen O-4' und O-5' und der C-5-C-6-Doppelbindung. Auch eine wasserstoffbrückenähnliche Beziehung zwischen den C-6-Protonen und dem Sauerstoff der 5'-OH-Gruppe fällt weg. Auf der anderen Seite der Base ist keine Beziehung zwischen dem C-2-Carbonylsauerstoff und der 2'-OH-Gruppe, die hier durch ein Proton ersetzt ist, möglich. Die Meßergebnisse zeigen, daß die Base trotzdem im 2'-deoxy-5,6-Dihydrouridin eine ähnliche Konformation hat wie im 2'-deoxy-Uridin, da die Zuckerprotonensignale im 2'-deoxy-5,6-Dihydrouridin nur kleinere Verschiebungen aufweisen, die auf den geänderten induktiven Effekt der Base und die geänderte Basizität des C-2-Carbonylsauerstoffs und des N-1-Stickstoffs zurückgeführt wer-

den können.

Zusammenfassend kann man sagen, daß im DMSO der Lösungsmittleinfluß geringer sein wird als im Wasser, dafür aber die intramolekularen Wechselwirkungen begünstigt sind, weil im Wasser sich eher ein Lösungsmittelmolekül zwischen aktive Gruppen des gelösten Nucleosids schieben kann als ein DMSO-Molekül. Außerdem ist die Beweglichkeit der Base im Wasser stärker eingeschränkt, besonders beim Adenosin, weil sich der Lösungsmittelkäfig der kleinen Wassermoleküle wesentlich besser der Form des gelösten Moleküls anpassen kann als die großen DMSO-Moleküle.

Dem Zusammenwirken von Lösungsmittel und Nucleosid muß man zuschreiben, daß sich die Kopplungskonstante $J_{1'2'}$ bei Uridin von D_2O zum DMSO vergrößert, während sie sich beim Adenosin nicht verändert. Am deutlichsten wird die Erscheinung bei den 2'-deoxy-Verbindungen, wo sowohl das Adenosin- als auch das Uridinderivat in DMSO und D_2O gleiche Kopplungskonstanten haben. Da die Kopplungskonstante $J_{1'2'}$ in Uridin und der β -D-Ribofuranose mit 3 bis 4 Hz in der gleichen Größenordnung liegt und nur in den Adenosinderivaten größer ist, kann man daraus schließen, daß im Adenosin Kräfte wegfallen, die im Uridin und der β -D-Ribofuranose die Zuckerkonformation beeinflussen.

Von Sunderalingam et al. (39) ist bei der Röntgenstrukturanalyse von UpA beobachtet worden, daß sich in die Lücke zwischen der 2'-OH-Gruppe und dem C-2-Carbonylsauerstoff ein Molekül Kristallwasser einlagert, und dadurch beide Sauerstoffe durch Wasserstoffbrücken miteinander verbinden kann. Eine derartige Kombination würde dem Modell nach die

3'-endo-Form, der ja die kleinere Kopplungskonstante entspricht, erzwingen. Im 2'-deoxy-Uridin ist der Sauerstoff an dem C-2' nicht mehr vorhanden, so daß hier wieder die normale Zuckerkonformation zu erwarten ist, was die Kopplungskonstante von ca 6,5 Hz auch bestätigt.

5.2. Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit

Untersuchungen von Schweizer et al. (20,40) haben gezeigt, daß Adenosin sich mit zunehmender Konzentration zu größeren Molekülverbänden zusammenschließen kann aufgrund von π -Wechselwirkungen zwischen den Basen. Dieser Vorgang, bei dem sich die Basen der Nucleoside oder Nucleotide in einer ganz bestimmten Art übereinanderlegen, wird als "Stacking" bezeichnet. Durch das Stacking kommen die Protonen der Nucleosidderivate in den Ringstrombereich der benachbarten Basen und werden je nach Lage im Feld des Ringstroms zu höherem oder niederem Feld verschoben. Daraus resultiert hauptsächlich für H-8, H-2, H-1' und H-5' eine konzentrationsabhängige Verschiebung der Protonensignale. Beim Uridin ist es bekannt, daß die Selbstassoziation der Basen wesentlich geringer ist als bei den Purinnucleosiden (41). Daher scheint es auch verständlich, daß die chemischen Verschiebungen der Pyrimidinverbindungen nicht konzentrationsabhängig sind (41). Diese Tatsache schließt aus, daß bei der Untersuchung der Reihe von Uridinderivaten Konzentrationseffekte für die beobachteten Verschiebungen verantwortlich gemacht werden müssen.

Das beim Adenosin beobachtete Base-Stacking sollte bei höheren Temperaturen aufgehoben werden. Dies

ist in den Arbeiten von Ts'o et al. (41) untersucht und bestätigt worden. Als eine Ursache für die Aufhebung des Base-Stacking kann auch eine freiere Rotation der Base genannt werden, die gleichzeitig Hinweise darauf geben sollte, welche der Verschiebungseffekte im wesentlichen auf die starrere Konformation zurückzuführen sind. Im Uridin, wo der Faktor des Base-Stackings vernachlässigt werden darf, sollten die Rückschlüsse aus temperaturabhängigen chemischen Verschiebungen daher ausschließlich auf durch die größere Beweglichkeit der Base gestörte Wechselbeziehungen hinweisen. Deshalb wurden die NMR-Spektren sowohl in D_2O als auch in DMSO bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen. Abb. 10

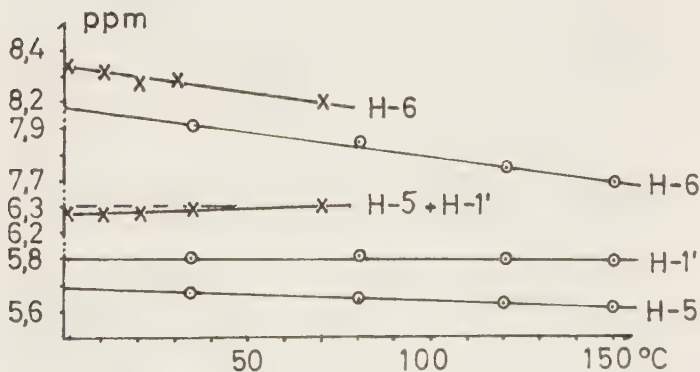


Abb. 10 Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung von H-6, H-5 und H-1' in D_2O (x-x-x) und DMSO (o-o-o)

zeigt, daß die chemische Verschiebung von H-6 am stärksten temperaturabhängig ist. Dies unterstützt die in 4.1. gegebene Interpretation, daß die Verschiebung des H-6-Signals durch eine Wechselwirkung

mit dem C-4'- und C-5'-Sauerstoff bedingt ist. Mit steigender Temperatur wird diese Wechselwirkung offensichtlich gestört. Das Signal von H-1' zeigt keine große Temperaturabhängigkeit. Das Signal des 5-Protons wird in D₂O etwas nach niederem Feld verschoben.

Diese zunächst nur in orientierender Form durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß für die energetische Stabilität der Konformation ein erheblicher Entropiebeitrag des Wassers zu berücksichtigen ist. Die Stellung der Base bei einem Torsionswinkel von -30° und 150° stellt für das Molekül die kompakteste Form mit der kleinsten Oberfläche dar, so daß in diesem Fall die Zahl der an der Moleküloberfläche in geordneter Struktur festgelegten Wassermoleküle am geringsten ist. Jede andere Konformation würde für die Entropie des Gesamtsystems eine höhere Energie erfordern.

6. Beziehungen zwischen Konformation und enzymatischem Verhalten

Bei der Reaktion der Pankreasribonuclease A, die spezifisch ist für die Spaltung der 3'-Phosphorsäureester der Pyrimidinnucleoside, legt sich die Base aufgrund einer π -Wechselwirkung auf den Phenylring eines Phenylalanins (42). Die anionische Phosphatgruppe wird durch protonierende Gruppen des Enzyms gebunden. Die Base wird dabei in einer Stellung fixiert, in der sie das Proton der 2'-OH-Gruppe mit ihrem C-2-Carbonylsauerstoff übernehmen kann, wodurch der 2'-Sauerstoff als stärkeres Nucleophil in der Lage ist, an der Phosphatgruppe anzugreifen. Dazu muß die Base in der anti-Stellung stehen, die

einem Torsionswinkel von ca -30° entspricht. Bei Uridinderivaten, die zwar einen C-2-Carbonylsauerstoff besitzen, um das Proton der 2'-OH-Gruppe zu übernehmen, wo die Base jedoch aufgrund einer Substitution der 6-Stellung einen anderen Torsionswinkel als im Uridin einnimmt, sollten diese katalytischen Funktionen ausfallen, die Aktivierungsenergie sollte um Größenordnungen zunehmen. Tatsächlich findet man, daß die Diester des 6-Methyluridins mit seinem hier wahrscheinlich gemachten Torsionswinkel von ca -90° nicht mehr gespalten werden (42). Dies kann jetzt zufriedenstellend dadurch erklärt werden, daß bei einer Bindung der Phosphatgruppe an das Enzym die Base jetzt in einem Winkel von ca 60° zu dem Phenylalaninring steht. Dadurch wird die Auflagerung und die Übernahme des Protons der 2'-OH-Gruppe verhindert. Die fehlende Wechselwirkung zwischen der Base und dem Phenylalaninring zeigt sich im Ausbleiben eines Differenzspektrums (42), wenn 6-Methyluridin-2'(3')-phosphat als Inhibitor mit dem Enzym gemischt wird. Wenn die Base um 180° aus der anti-Stellung in die syn-Stellung gedreht wäre, sollte zwar die Katalyse unmöglich, diese Wechselwirkung jedoch noch vorhanden sein. Daher kann die Drehung um ca. 60° auch durch diesen Befund bestätigt werden.

Neben den Phosphorsäurediestern der Pyrimidinnucleoside sind auch die Diester der 8-Oxo-Purinnucleoside recht gute Substrate, obwohl die Diester der Purinnucleoside sonst von der RNase A nicht gespalten werden (43). Wenn in den 8-Oxo-Purinnucleosiden die Base einen Torsionswinkel von 150° einnimmt, kommt der C-8-Sauerstoff in eine Lage, die der des C-2-Carbonylsauerstoffs im Uridin ähnelt.

Das Auftreten von Differenzspektren und einem CD-Effekt (44) ist jetzt auf der Basis der Diskussion in 4.4. leicht erklärbar. Danach kann auch der C-8-Sauerstoff in den 8-Oxo-Purinen das Proton der 2'-OH-Gruppe übernehmen und die Basenkatalyse ausführen.

Bei der RNase T₂ wird die Base des Substrats ebenfalls durch hydrophobe Kräfte an der Enzymoberfläche festgelegt. Eine katalytische Funktion, wie die Übernahme des Protons der 2'-OH-Gruppe bei der RNase A, wird hier von der Base nicht ausgeübt. Bei diesem Enzym müßten zwei um 180° unterschiedene Stellungen der Base den Anforderungen genügen, um als Substrat der RNase T₂ geeignet zu sein. Es wurde gefunden (45), daß alle Diester von Nucleosiden Substrate sind, von denen angenommen werden muß, daß ihre Basen in syn- oder anti-Stellung vorliegen. Man sieht jetzt, daß Diester von Nucleosiden, bei denen der Torsionswinkel in einem Zwischenbereich liegt, wie beim 6-Methyluridin und dem 8-Brom-Guanosin, keine oder äußerst schlechte Substrate sind.

Bei der Ribonuclease T₁ wird das Substrat an der Phosphatgruppe und der Carboxamidgruppierung der Guaninbase gebunden. Beide Gruppierungen müssen demnach einen genau definierten Abstand haben. Daher können Guanosinderivate, deren Basen einen anderen Torsionswinkel als den der im Guanosin vorliegenden anti-Stellung einnehmen, nicht gebunden werden. Es zeigt sich, daß das 8-Brom-Guanosin noch ein schwaches Substrat ist, das in syn-Stellung vorliegende 8-Oxo-Guanosin jedoch kaum noch reagiert.

Das weiter oben beschriebene Base-Stacking kann in

Dinucleotiden nur dann im nennenswerten Umfang stattfinden, wenn beide Basen schon vorher in anti-Stellung fixiert waren. Enzymatische Synthesen von Dinucleosidphosphaten aus cyclischen Phosphaten und Nucleosiden gelingen bei der Pankreasribonuclease nur, wenn beide Komponenten in der anti-Stellung vorliegen, und damit schon vor der Reaktion zum Stacking kommen (46). Das gleiche gilt für die Synthese von Polynucleotiden, bei denen die Kettenverlängerung ebenfalls ein Stacking der folgenden Base mit dem Rest voraussetzt. Poly-6-Methyluridin läßt sich deshalb mit der Polynucleotidphosphorylase nicht synthetisieren.

Die jetzt vorliegenden Kenntnisse sollten uns in die Lage versetzen, noch eine Reihe von Reaktionen oder auch Anomalien zu verstehen und eventuell auch Voraussagen zu machen, welche Verbindungen bei bestimmten Umsetzungen Erfolge erwarten lassen.

7. Zusammenfassung

Die Untersuchungen zur Konformation der Nucleinsäurederivate beschränkten sich bisher immer auf kleinere Serien und einzelne Problemstellungen. Die Frage, welche Effekte für die Stabilität einer bestimmten Konformation verantwortlich sind, konnte deshalb noch nicht zusammenfassend beantwortet werden. Je nach angewandter Methodik und Auswahl der Nucleosidderivate kamen unterschiedliche Ergebnisse und Interpretationen heraus.

Es wurde deshalb eine größere Serie von Purin- und Pyrimidinnucleosiden und modifizierten Derivaten synthetisiert und NMR-spektroskopisch untersucht. Die Auswertungen der Meßreihen lassen folgendes erkennen:

Die freie Drehbarkeit der Base um die glycosidische Bindung wird offensichtlich nicht durch einen einzelnen Effekt behindert. Mehrere energetisch geringe Effekte, die allein nicht in der Lage sind, die freie Drehbarkeit der Base bei Normalbedingungen einzuschränken, wirken kooperativ zusammen und liefern stabilisierte Konformationen.

Aus den lösungsmittelabhängigen chemischen Verschiebungen der Basenprotonen und anderen Lösungsmittelleffekten läßt sich erkennen, daß ein großer Teil der Stabilität der Nucleosidkonformation aus einem Entropiebeitrag des Wassers herrührt. Modellbetrachtungen und die gewonnenen Aussagen zur Zuckerkonformation zeigen, daß die syn- und anti-Konformation kompakteste Formen des Moleküls darstellen mit der kleinsten Oberfläche, um die sich Wasser in geordnetem Zustand anlagern kann. Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Wechselwirkungen, die

allein nicht in der Lage sind, eine bestimmte Konformation der Base zu erzwingen, bestimmen nur, welche der beiden kompaktesten Formen von dem Nucleosid bevorzugt wird.

Die in den meisten Verbindungen vorliegende anti-Konformation scheint im wesentlichen durch eine Wechselwirkung im Bereich des C-6-Kohlenstoffatoms in den Pyrimidin- und des C-8-Kohlenstoffatoms in den Purinbasen mit den C-4'- und C-5'-Sauerstoffen des Zuckers determiniert zu werden. Die gefundenen Daten zwingen zur Annahme, daß eine Dipolwechselwirkung besteht zwischen den freien Elektronenpaaren des C-4'-Sauerstoffs und der 5-6-Doppelbindung in den Pyrimidin- und der 7-8-Doppelbindung in den Purinbasen, die zusätzlich eine induzierte Polarisierung der Doppelbindung bewirkt, wodurch die Acidität des C-6- bzw. C-8-Protons erhöht wird. Dadurch wird H-6 bzw. H-8 verstärkt in die Lage versetzt, mit dem Sauerstoff der 5'-OH-Gruppe eine wasserstoffbrückenähnliche Beziehung einzugehen. Diese Wechselwirkung scheint auch dafür mitverantwortlich zu sein, daß die 5'-OH-Gruppe in der gauche-gauche-Stellung vorliegt, die eigentlich wegen der Nachbarschaft der beiden Sauerstoffe O-4' und O-5' nicht günstig ist. Das C-6-Proton scheint die abstoßende Wirkung zwischen den beiden Sauerstoffen zu neutralisieren.

Auf der anderen Seite der Base läßt sich kein direkter Nachweis erbringen, daß der C-2-Carbonylsauerstoff bzw. der 3-Stickstoff durch eine Wasserstoffbrücke zur 2'-OH-Gruppe zur Stabilität der Konformation beiträgt. Es soll hier allerdings nicht bestritten werden, daß unter bestimmten Be-

dingungen diese Beziehungen eine funktionelle Rolle spielen können. Diese Gruppen sind jedoch durch ihren diamagnetischen Anisotropieeffekt für Verschiebungen von Zuckerprotonensignalen verantwortlich. Aus diesen Verschiebungen, besonders der des C-2'- und C-1'-Protons, läßt sich die begünstigte Konformation recht gut erkennen.

Ein anderer Torsionswinkel der Base stellt sich nur dann ein, wenn durch eine Substitution die übliche anti-Stellung nicht mehr eingenommen werden kann, sei es aus sterischen Gründen, oder daß der neue Substituent bessere Wechselwirkungen in der syn-Stellung ermöglicht. Beim 6-Methyluridin muß nach den gefundenen Daten ein Torsionswinkel von -90° angenommen werden, im Gegensatz zu der bisher vertretenen Meinung, daß die Base in syn-Stellung stehen sollte. Für die 6-Oxo-Derivate des Uridins scheint die postulierte syn-Stellung gerechtfertigt. Ein ähnlicher Unterschied zeigt sich zwischen den 8-Brom- und 8-Oxo-Purinderivaten. Für die 8-Brom-Verbindungen ist ein Torsionswinkel von -90° zu fordern, während für die 8-Oxo-Derivate ein Torsionswinkel von 150° naheliegt, der die 8-Oxo-Gruppe in eine ähnliche Lage zur 2'-OH-Gruppe bringt, wie der C-2-Carbonylsauerstoff sie im Uridin einnimmt.

Aufbauend auf diesen Überlegungen könnte im Verlauf weiterer Untersuchungen eine quantitative Behandlung dieses Problems zu wesentlichen Erkenntnissen über die Hintergründe der fixierten Konformation von Nucleosidderivaten führen. Außerdem lassen sich jetzt mit diesen Kenntnissen eine Reihe von Enzymreaktionen erklären. Die Wichtigkeit der Konformation für sich selbst reduplizierende Systeme wird erkennbar.

8. Experimenteller Teil

1. Meßmethoden

Zur Untersuchung und Identifizierung der in der Arbeit aufgeführten Verbindungen wurden folgende Meßmethoden benutzt:

a. CD-Spektroskopie

Ca 0,1 micromol der Substanz, die genaue Konzentration wurde durch UV-Absorptionsmessungen bestimmt, wurden in Wasser gelöst. Die pH-Werte wurden mit NaOH, HCl, Natriumacetat- und Glycinpuffer eingestellt. Die Messungen wurden an einem CARY 61 von VARIAN durchgeführt.

b. NMR-Spektroskopie

Von der zu messenden Substanz wurden in D₂O ca 0,1 mmol und in DMSO-d₆ ca 0,3 mmol gelöst. Von schwerlöslichen Substanzen wurden gesättigte Lösungen hergestellt. In D₂O wurden die pH-Werte mit NaDO und DCl eingestellt und im Proberöhrchen direkt gemessen. Die Messungen wurden auf einem VARIAN TR 60 und VARIAN XL 100 durchgeführt.

c. UV-Spektroskopie

Eine Lösung der zu untersuchenden Substanz wurde in einer Quarzküvette (1 cm Schichtdicke, Helma QS Nr. 104) mit einem CARY 15 von VARIAN gemessen. Die pH-Werte wurden mit NaOH, HCl, Phosphat- und Acetatpuffer eingestellt.

d. pH-Messungen

Die pH-Werte wurden mit einer Einstabmeßkette (In-

gold Typ 405) und einer MikroEinstabmeßkette von Ingold und einem pH-Meter (Radiometer, Kopenhagen) gemessen. Nach Glasoe und Long (48) läßt sich der pD-Wert nach folgender Gleichung umrechnen:

$$pD = pH \text{ (gem.)} + 0,4$$

2. Analytik der Substanzen

Die in der organischen Chemie üblichen Methoden zur Identifizierung einzelner Substanzen führen bei den untersuchten Verbindungen nicht immer zu dem gewünschten Erfolg, da gerade bei spektroskopischen Untersuchungen auch geringe Verunreinigungen durch ähnliche oder gar isomere Verbindungen, die von der normalen organischen Analyse nicht erfaßt werden, zu Verfälschungen der Ergebnisse führen können. Daher wurden folgende Nachweisreaktionen und Reinheitsuntersuchungen durchgeführt:

Die Rf-Werte der Verbindungen wurden mit Hilfe der absteigenden Papierchromatographie auf Papier (Schleicher & Schüll Nr. 2043 b Mgl.) oder aufsteigend auf Dünnschichtplatten (CE- und Si-F-Platten von Riedel) bestimmt.

Folgende Fließmittel wurden benutzt:

A: Isopropanol : Wasser : 2-n-Ammoniak = 7 : 2 : 1

B: Isopropanol : Wasser : konz. Ammoniak = 7 : 2 : 1

C: ges. Ammoniumsulfatlösung : 1-n-Natriumacetat :

Isopropanol = 80 : 18 : 2

D: Chloroform : Methanol = 20 : 1

Die Nucleoside und ihre Derivate lassen sich auf dem Chromatogramm aufgrund ihrer UV-Absorption ohne weitere Vorbehandlung unter einer UV-Lampe sichtbar machen.

Nucleoside können durch ihre cis-Diolstruktur der Ribofuranose durch Besprühen des Chromatogramms mit einer 0,3%igen Bleitetraacetatlösung in Eisessig und nach ca einer Minute mit einer 3%igen Benzidinlösung in Eisessig sichtbar gemacht werden. Ribofuranosederivate erscheinen als weißer Fleck auf blauem Grund. Substanzen, die mit Bleitetraacetat reagieren, oder Reduktionsmittel stören bei diesem Nachweis.

Nucleotide können aufgrund ihrer Phosphatgruppe auf dem Chromatogramm nachgewiesen werden. Man besprüht mit einer perchlorsauren Ammoniummolybdatlösung. Nach Bestrahlung mit UV- oder Sonnenlicht und eventuellem kurzzeitigem Erhitzen auf ca 90° im Trockenschrank erscheinen phosphorhaltige Substanzen als blauer Fleck auf hellem Untergrund.

Zusammensetzung des Sprühreagenzes:

25 ml 4%ige Ammoniummolybdatlösung, 10ml 1-N-Salzsäure und 5 ml 60%ige Perchlorsäure werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Zur Identifizierung wurden die einzelnen Bänder auf dem Chromatogramm unter der UV-Lampe markiert, ausgeschnitten und mit Wasser eluiert. Anschließend wurden von den Eluatn die UV-Spektren bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen.

3. Herkunft und Darstellung der zu den Messungen verwandten Verbindungen:

1	Ribose	PWA, Mannheim
2	Uracil	-"-
3	Uridin	-"-
4	2'-deoxy-Uridin	-"-

- | | | |
|----|-----------------------------|--|
| 5 | 2',3'-Isopropyliden-Uridin | PWA, Mannheim |
| 6 | 3',5'-cyclische Uridylsäure | Böhringer & Söhne, Mannheim |
| 7 | 5'-deoxy-Uridin | aus 22 durch Hydrolyse mit HCl |
| 8 | 5'-deoxy-5'-Jod-Uridin | aus 25 durch Hydrolyse mit HCl |
| 9 | 5'-deoxy-5'-Brom-Uridin | aus 24 durch Hydrolyse mit HCl |
| 10 | 2'-deoxy-2'-azido-Uridin | Arbeitskreis H.Witzel, Münster |
| 11 | 2-Thio-Uridin | "" |
| 12 | N-3-Methyluridin | nach G.Gassen (49)
durch Methylierung von Uridin mit ätherischer Diazomethanlösung |
| 13 | N-3-Aminouridin | Arbeitskreis H.Witzel, Münster |
| 14 | 5-Chlor-Uridin | nach G.Gassen (49)
aus Uridin in Eisessig und mit Chlor gesättigtem CCl ₄ |
| 15 | 5-Brom-Uridin | nach G.Gassen (49)
aus Uridin in Dioxan mit Brom in CCl ₄ |
| 16 | 5-Jod-Uridin | nach G.Gassen (49)
aus Uridin in 0,5 n HNO ₃ mit Jod |
| 17 | 6-Methyluridin | Arbeitskreis H.Witzel, Münster |
| 18 | 6-Azauridin | Arbeitskreis H.Witzel, Münster |
| 19 | 5,6-Dihydro-Uridin | nach A.R.Hanze (50)
durch katalytische Hydrierung von Uridin mit 5% Rhodium auf Aluminiumoxyd in Wasser
Ausbeute quantitativ |
| 20 | 2'-deoxy-5,6-Dihydro-Uridin | durch katalytische Hydrierung von 2'-deoxy-Uridin mit 5% Rhodium auf Aluminiumoxyd
Ausbeute quantitativ |
| 21 | N-3-Harnsäure- | Arbeitskreis H.Witzel, Münster |

- | | | |
|----|--|---|
| 22 | 5'-deoxy-2',3'-
Isopropyliden-
Uridin | aus 5'-deoxy-5'-Jod-2',3'-
Isopropyliden-Uridin durch
katalytische Hydrierung mit
Paladium |
| 23 | 5'-deoxy-5'-Chlor-
2',3'-Isopropyliden-
Uridin | H.Follmann, Marburg |
| 24 | 5'-deoxy-5'-Brom-
2',3'-Isopropyliden-
Uridin | -"- |
| 25 | 5'-deoxy-5'-Jod-
2',3'-Isopropyliden-
Uridin | -"- |
| 26 | 5'-deoxy-5'-Cyano-
2',3'-Isopropyliden-
Uridin | E.Böhnke, Marburg |
| 27 | 5,6-Dihydro-2',3'-
Isopropyliden-
Uridin | durch katalytische Hydrierung
von 2',3'-Isopropyliden-Uri-
din mit 5% Rhodium auf Alu-
miniumoxyd |
| 28 | 5'-Uridylsäure | PWA, Mannheim |
| 29 | Uracil-Trialkohol | nach L.M.Lerner (51)
durch Spaltung mit Natrium-
perjodat und anschließender
Reduktion mit Natriumbor-
hydrid |
| 30 | Adenin | PWA, Mannheim |
| 31 | Adenosin | -"- |
| 32 | 8-Brom-Adenosin | Arbeitskreis H.Witzel, Mün-
ster |
| 33 | 8-Oxo-Adenosin | -"- |
| 34 | 2'-deoxy-Adenosin | PWA, Mannheim |
| 35 | 2',3'-Isopropyli-
den-Adenosin | -"- |
| 36 | 3',5'-cyclische
Adenylsäure | -"- |
| 37 | Guanosin | -"- |
| 38 | 8-Brom-Guanosin | Arbeitskreis H.Witzel, Mün-
ster |
| 39 | 8-Oxo-Guanosin | -"- |
| 40 | Xanthosin | -"- |
| 41 | 5'-Adenylsäure | PWA, Mannheim |

4. CD-Meßergebnisse

Mit den NMR-Messungen wurden bei den meisten Verbindungen gleichzeitig die CD-Spektren aufgenommen. Trotz verschiedener theoretischer Betrachtungen (52,53,54) lassen sich die auftretenden Cotton-Effekte bisher noch nicht mit den bei den NMR-Untersuchungen gefundenen Konformationen korrelieren. Durch die mannigfaltigen Beeinflussungsmöglichkeiten des Cotton-Effektes sind die hier gegebenen Zusammenhänge derart komplexer Natur, daß es vorerst nicht sinnvoll erscheint, die Problematik der CD-Messungen hier aufzugreifen. Wieweit sich Anhaltspunkte für eine Ausnutzung der CD-Spektren zur Aufklärung der Konformation in einer Reihe ähnlicher Nucleosidderivate gewinnen lassen, ist in der Diplomarbeit (44) ausführlich behandelt worden. An dieser Stelle soll deshalb nur eine Aufstellung der in der Diplomarbeit noch nicht behandelten Verbindungen beigelegt werden.

Verbindung	pH		10^{-3}
Uridin	3	268	8,4
	11	265	12,0
2',3'-Isopropyliden-Uridin	3	268	6,0
	11	264	7,9
2'-Uridylsäure	6	268	6,2
	10	264	7,2
3'-Uridylsäure	6	268	8,7
	10	264	10,8
5'-Uridylsäure	6	268	8,1
	10	264	9,7
2',3'-cyclische Uridylsäure	5,6	268	4,5
3',5'-cyclische Uridylsäure	5,6	265	14,8
	10	263	18,7
Uridin-Boratkomplex	11	268	8,0

2'-deoxy-2'-azido-Uridin	3,2	264	12,6
	10,5	262	21,8
2'-deoxy-2'-Thio-Uridin	5,6	267	33,4
	10	264	56,0
5'-deoxy-Uridin	3	268	8,5
	10	265	12,1
5'-deoxy-2',3'-Isopropyliden-Uridin	3	268	5,4
	10	264	7,9
5'-deoxy-5'-Chlor-2',3'-Isopropyliden-Uridin	3	268	5,5
	10	264	8,2
5'-deoxy-5'-Brom-2',3'-Isopropyliden-Uridin	3	264	4,9
	10	268	7,6
5'-deoxy-5'-Jod-2',3'-Isopropyliden-Uridin	3	266	6,0
	10	264	8,5
5'-deoxy-5'-Cyano-2',3'-Isopropyliden-Uridin	3	264	5,0
	10	263	9,5
N-3-Methyluridin	5,6	268	12,0
	11	268	12,0
6-Methyluridin	5,6	-	0
	10,5	262	-6
6-Azaauridin	5,6	256	-10
	11	298	2,5
	11	262	-9,4
Arauridin	4,5	266	24,4
	10,0	263	34,0
2'-deoxy-2'-Thio-Arabino-furanosyl-Uridin	4,5	267	8,3
	10,0	262	22,6
N-3-Harnsäureribosid	3,1	288	8,9
	9	299	1,55
5,6-Dihydro-Uridin	3	215	-6,4
	9	208	-8,3
2'-deoxy-5,6-Dihydro-Uridin	6,5	215	-0,3

9. Literaturverzeichnis

1. K.Sato und F.Egami
J.Biochem. (Tokyo). 44 (1957) 753
2. P.R.Whitfeld und H.Witzel
Biochim.Biophys.Acta 72 (1963) 338
3. O.Pongs Dissertation, Marburg 1968
4. H.Witzel inProgress in Nucleic Acid Research
2 (1963) 221
5. G.Gassen und H.Witzel
Europ.J.Biochem. 1 (1967) 36
6. H.Follmann, H.Wieker und H.Witzel
Europ.J.Biochem. 1 (1967) 243
7. J.Donohue und K.N.Trueblood
J.Mol.Biol. 2 (1960) 363
8. J.J.Fox, L.F.Cavalieri und N.Chang
JACS 75 (1968) 4315
9. P.O.P.Ts'ó, S.A.Rapaport und F.J.Bollum
Biochemistry 5 (1966) 4153
10. M.Sunderalungam und L.H.Jensen
J.Mol.Biol. 13 (1965) 914
11. R.E.Schirmer, J.P.Davis, J.H.Noggle und P.A.Hart
JACS 94 (1972) 2561
12. M.Sunderalingam
Biopolymeres 7 (1969) 821
13. A.E.V.Haschemeyer und H.M.Sobell
Acta Crystallogr. 18 (1965) 525
14. B.J.Blackburn, A.A.Grey, J.C.P.Smith und F.E.
Hruska Can.J.of Chem. 48 (1970) 2866
15. M.P.Schweizer, J.F.Witkowski und R.K.Robins
JACS 93 (1971) 277
16. H.Dugas, B.J.Blackburn, R.K.Robins, R.Deslauriers
und I.C.P.Smith
JACS 93 (1971) 3468
17. M.W.Winkley und R.K.Robins
J.Org.Chem. 33 (1968) 2822
18. M.W.Winkley und R.K.Robins
J.Chem.Soc.C. 791 (1969)
19. F.E.Hruska JACS 93 (1971) 1795
20. M.P.Schweizer, M.P.Broom, P.O.P.Ts'ó und D.P.Hollis
JACS 90 (1968) 1042

21. P.O.P.Ts' o, N.S.Kondo, M.P.Schweizer und
D.P.Hollis Biochemistry 8 (1969) 997
22. P.A.Hart und J.P.Davis
JACS 93 (1971) 753
23. M.Karplus J.Chem.Phys. 30 (1959) 11
24. R.V.Lemieux, R.K.Kullnig, H.J.Bernstein und
W.G.Schneider
JACS 80 (1958) 6098
25. A.D.Cohen, N.Scheppard und J.J.Turner
Proc.Chem.Soc. (1958) 118
26. C.D.Jardetzky
JACS 82 (1960) 289
27. F.E.Hruska, A.A.Grey und J.C.P.Smith
JACS 92 (1969) 4088
28. M.Sunderalingam und L.H.Jensen
J.Mol.Biol. 13 (1965) 930
29. A.E.V.Haschemeyer und A.Rich
J.Mol.Biol. 27 (1967) 69
30. C.Giessner und B.Pullman
Compt.Rend. 261 (1965) 2521
31. K.Kopka Diplomarbeit, Münster 1971
32. R.J.Abraham und K.G.R.Pachler
Mol.Phys. 7 (1964) 165
33. E.Shefter und K.N.Trueblood
Acta Cryst. 18 (1965) 1067
34. Substanzen, die freundlicherweise vom Arbeits-
kreis H.Witzel in Münster zur Verfügung gestellt
wurden
35. W.Luck Naturwiss. 52 (1965) 3
36. M.G.Stout und R.K.Robins
J.Org.Chem. 33 (1968) 1219
37. H.Follmann und G.Gremels in Vorbereitung
38. J.H.Prestegard und S.I.Chan
J.Amer.Chem.Soc. 91 (1969) 2843
39. J.Rubin, T.Brennan und M.Sunderalingam
Biochemistry 11 (1972) 3112
40. A.D.Broom, M.P.Schweizer und P.O.P.Ts' o
JACS 89 (1967) 3612
41. P.O.P.Ts' o, M.P.Schweizer, S.I.Chan
JACS 87 (1965) 5241

42. R.Bald Dissertation, Marburg 1969
43. H.G.Gassen und H.Witzel
Europ.J.Biochem. 1 (1967) 36
44. R.Pfeil Diplomarbeit, Marburg 1971
45. P.M.Kaiser Dissertation, Marburg 1972
46. Hovemann Diplomarbeit, Münster 1972
47. R.U.Lemieux und J.D.Stevens
Can.J.of Chem. 44 (1966) 249
49. H.G.Gassen Dissertation, Marburg 1965
50. A.R.Hanze JACS 89 (1967) 6720
51. L.M.Lerner Carbohyd.Res. 13 (1970) 465
52. T.R.Emerson, R.J.Swan und T.L.V.Ulbricht
Biochemistry 6 (1967) 843
53. W.H.Inskeep, D.W.Miles und H.Eyring
JACS 92 (1970) 3866
54. W.H.Inskeep, D.W.Miles und H.Eyring
JACS 92 (1970) 3872

Meinem sehr verehrten Lehrer,
Herrn Professor Dr. Dr. H. Witzel,
danke ich aufrichtig für seine stets
wohlwollende, anregende und dis-
kussionsfreudige Hilfe während der
Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 4. Oktober 1943 wurde ich als Sohn des Dr. Emanuel Pfeil und seiner Ehefrau Dr. Susanne, geborene Toussaint, in Hirschhorn am Neckar geboren.

Von 1950 bis 1954 besuchte ich die Volksschule in Biedenkopf und Marburg, anschließend das Realgymnasium für Jungen in Marburg. Hier legte ich Ostern 1965 die Reifeprüfung ab. Von April 1965 bis April 1967 war ich als Zeitsoldat bei der Bundeswehr.

Seit dem SS 1967 studiere ich an der Philipps-Universität in Marburg Chemie. Das Vordiplom bestand ich im April 1969, das mündliche Hauptdiplom im Dezember 1970. Unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Witzel beschäftigte ich mich während meiner Diplom- und Doktorarbeit hauptsächlich mit biochemischen Problemen, vor allem auf dem Gebiet der Nucleosid-Konformation.

Meine akademischen Lehrer waren:

Berndt, Bock, Dehnicke, Dimroth, Follmann,
Försterling, Karlson, Kindl, Kirmse, Kuhn,
Mahr, Nöth, Pfeil, Reichardt, Schäfer, Schneider,
Schweig, Seelig, Senger, Stuke, P. Schmidt,
Walcher, Witzel

